

Tese de Doutorado

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE LÍTIO E MEMANTINA NA
MEMÓRIA E NEUROINFLAMAÇÃO EM UM MODELO
ANIMAL DE DEMÊNCIA DO TIPO DOENÇA DE ALZHEIMER
EM RATOS**

DANIEL PROENÇA FEIJÓ



**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

DANIEL PROENÇA FEIJÓ

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE LÍTIO E MEMANTINA NA
MEMÓRIA E NEUROINFLAMAÇÃO EM UM MODELO
ANIMAL DE DEMÊNCIA DO TIPO DOENÇA DE ALZHEIMER
EM RATOS**

Tese de Doutorado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade do
Extremo Sul Catarinense para obtenção
do título de Doutor em Ciências da
Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Josiane Budni.

Criciúma
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

F297e Feijó, Daniel Proença.

Efeito da associação de lítio e memantina na memória e neuroinflamação em um modelo animal de demência do tipo Doença de Alzheimer em ratos / Daniel Proença Feijó. – 2017.

94 p: il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2017.

Orientação: Josiane Budni.

1. Alzheimer, Doença de – Tratamento. 2. Lítio – Uso terapêutico. 3. Memantina – Uso terapêutico. 4. Demência. 5. Neuroinflamação. I. Título.

CDD. 23ª ed. 615.1

Bibliotecária Rosângela Westrupp – CRB 14º/364

Biblioteca Central Prof. Eurico Back – UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pelo candidato **Daniel Proença Feijó** sob o título “EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE LÍTIO E MEMANTINA NA MEMÓRIA E NEUROINFLAMAÇÃO EM UM MODELO ANIMAL DE DEMÊNCIA DO TIPO DOENÇA DE ALZHEIMER EM RATOS”, para obtenção do grau de DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela “APROVAÇÃO” da Tese.

Criciúma, SC, 01 de setembro de 2017.

Prof. Dr. ALEXANDRE PASTORIS MÜLLER
Membro Relator – UNESC

Prof. Dr. EMÍLIO LUIZ STRECK
Membro Interno – UNESC

Prof.ª Dra. LUCIANE BISOGNIN CERETTA
Membro Externo – UNESC

Prof.ª Dra. CLARISSA MARTINELLI COMIM CASSOL
Membro Externo – UNISUL

Prof.ª Dra. Josiane Budni
Orientadora

Prof.ª Dra. Maria Inês da Rosa
Coordenadora do PPGCS

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense

Agradecimentos

Agradeço a Deus e a toda minha família, por terem contribuído com a concretização de mais essa etapa da minha vida me concedendo força, paz e proteção...

À professora Dr^a Josiane Budni por toda sua atenção, dedicação e esforço para que eu pudesse ter confiança e segurança na realização deste trabalho.

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é a demência mais prevalente entre as doenças neurodegenerativas. O declínio cognitivo é a principal característica desta demência. As características fisiopatológicas incluem, acúmulo de β -amiloide₁₋₄₂ (β A₁₋₄₂), emaranhados neurofibrilares e neuroinflamação. Atualmente, os fármacos aprovados para doença não podem evitar a progressão desta. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do lítio e/ou memantina na memória e neuroinflamação em um modelo animal de demência do tipo DA induzido pela administração de oligômeros β A₁₋₄₂. Foram utilizados 160 ratos Wistar machos adultos, os quais foram administrados com β A₁₋₄₂ ou fluido cerebrospinal artificial (ACSF) intrahipocampal. Após 24 horas, iniciou-se o tratamento por via oral com memantina (5 mg/kg), lítio (5 mg/kg), água ou associação de memantina e lítio durante 17 dias. Entre o 14º e 18º foram realizados os testes comportamentais para avaliar memória espacial (labirinto octogonal), memória de trabalho (labirinto octogonal) e memória de habituação (campo aberto) nestes animais. No 18º dia, os animais foram submetidos a eutanásia, o córtex frontal e hipocampo foram dissecados para análises imunoquímicas. Foi possível observar que a administração de β A₁₋₄₂ causou danos na memória espacial e na memória de habituação quando comparado ao controle, e o tratamento com lítio, memantina e associação destes foram capazes de recuperar esses danos quando observado a latência e os erros totais para encontrar a recompensa no labirinto octogonal, e o número de cruzamentos no aparato de habituação ao campo aberto. Além disso, os animais que receberam a associação obtiveram uma performance ainda melhor já que foram mais rápidos e cometeram menos erros que o grupo administrado com β A₁₋₄₂, desde o primeiro dia do teste no labirinto octogonal. A memória de referência dos animais submetidos ao modelo foi recuperada por todos tratamentos, e a memória de trabalho foi recuperada com o tratamento com memantina ou associação de lítio e memantina. Houve aumento dos níveis de IL-1 β no córtex frontal e hipocampo dos animais administrados com β A₁₋₄₂, e este foi revertido pelo lítio, memantina e associação destes. Os níveis de TNF- α não foram alterados no córtex frontal, mas no hipocampo houve uma redução desta citocina com todos os tratamentos, exceto o grupo β A₁₋₄₂, quando comparado ao grupo controle. Houve redução dos níveis de IL-4 em ambas estruturas após a administração de β A₁₋₄₂, porém no córtex o tratamento com lítio, memantina e associação aumentaram esses níveis e no hipocampo apenas a memantina e a associação aumentou os níveis de

IL-4. Na sinalização da neuroinflamação avaliada no hipocampo foi possível observar que a administração de βA_{1-42} causou aumento do conteúdo de TLR2 e NLRP3. O tratamento com lítio e associação deste com memantina causou reversão da redução de TLR2. Apenas a associação causou reversão do aumento de NLRP3. Assim, o lítio, a memantina e associação de ambos mostrou ter resultados benéficos na memória dos animais e isso pode em parte ser explicado pela redução de citocinas e proteínas relacionadas a neuroinflamação. Parece que o efeito da associação está relacionado com a redução do NLRP3, uma proteína que compõe o complexo inflamassoma. Dessa forma, a associação destes fármacos se mostrou uma alternativa farmacológica para demências do tipo DA.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; β -amiloide 1-42; lítio; memantina; associação; neuroinflamação.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent neurodegenerative disease, its major feature is cognitive decline. The physiopathological features of the disease include accumulation of β -amyloid 1-42 ($A\beta_{1-42}$), neurofibrillary tangles and neuroinflammation. Currently, drugs approved for AD cannot prevent a progression of this. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effect of lithium or/and memantine on memory and neuroinflammation in an animal model of AD-like dementia model induced by administration of $A\beta_{1-42}$ oligomers. We used 160 adult male Wistar rats, which were administered intrahippocampal with $A\beta_{1-42}$ or artificial cerebrospinal fluid (ACSF). After 24 hours was started oral treatment with memantine (5 mg / kg), lithium (5 mg / kg), water, or association between memantine and lithium for 17 days. Experimental tests for memory and working memory (octagonal maze) and habituation memory (open-field task) in these animals were performed between the 14th and 18th days. On the 18th day, the animals were submitted to euthanasia, the frontal cortex and hippocampus were dissected for analysis. The $A\beta_{1-42}$ administration caused spatial and habituation memory impairment when compared to the control rats. The treatment with lithium, memantine and association of these were able to recover this impairment when observed latency and total errors to find a reward in the octagonal maze and the number of crossings on the open-field. In addition, the animals that received an association obtained a better performance since they were faster and made less errors than the group administered with $A\beta_{1-42}$ already since the first day on the octagonal maze. The reference memory of the animals submitted to the model was recovered by all treatments, and a working memory was recovered by the treatment with memantine or association of lithium and memantine. There was an increase in IL-1 β levels in the frontal cortex and hippocampus of the animals administered with $A\beta_{1-42}$, and lithium, memantine and their association reversed it. TNF- α levels were not altered in the frontal cortex, but in the hippocampus, all treatments reduced this cytokine, including in animals submitted to the model and control animals. There was a reduction in IL-4 levels in both structures following an administration of $A\beta_{1-42}$, but in the frontal cortex the treatment with lithium, memantine and association increased this levels and in the hippocampus only a memantine and an association with lithium increased IL-4 levels. In the hippocampus-evaluated signaling, $A\beta_{1-42}$ administration caused TLR2 and NLRP3 content increases, and memantine and its association with lithium reversed the TLR2 reduction,

and only the association between lithium and memantine caused a reversal of NLRP3 increase. Thus, lithium, memantine and association of both shown benefic results for the memory and this effect may be explained in part by the reduction of cytokines and proteins related to neuroinflammation. It appears that the effect of the association is related to the reduction of NLRP3, a protein from inflammasome complex. Thus, an association of these drugs was shown to be a pharmacological alternative for AD-like dementias.

Keywords: Alzheimer's disease; β -amyloid 1-42; lithium; memantine; association; neuroinflammation.

Lista de ilustrações

Figura 1: Representação esquemática do processamento de APP.....	25
Figura 2: Sinalização do βA no receptor NMDA.....	27
Figura 3: Ativação do inflamassoma NLRP3 por βA	31
Figura 4: Protocolo experimental da etapa 1.....	41
Figura 5: Protocolo experimental da etapa 2.....	42
Figura 6: Efeito do lítio (5mg/kg), memantina (5mg/kg) ou associação de lítio e memantina no teste de labirinto octogonal (latência e número de erros) realizado em ratos Wistar administrados com βA_{1-42}	48
Figura 7: Efeito do lítio (5mg/kg), memantina (5mg/kg) ou associação de lítio e memantina no teste de labirinto octogonal (memória de referência e memória de trabalho) realizado em ratos Wistar administrados com βA_{1-42}	49
Figura 8: Efeito do lítio (5mg/kg), memantina (5mg/kg) ou associação de lítio e memantina na habituação ao campo aberto realizado em ratos Wistar administrados com βA_{1-42}	51
Figura 9: Efeito do lítio (5mg/kg), memantina (5mg/kg) ou associação de lítio e memantina nos níveis da citocina IL-1 β em córtex frontal e hipocampo de ratos Wistar administrados com βA_{1-42}	52
Figura 10: Efeito do lítio (5mg/kg), memantina (5mg/kg) ou associação de lítio e memantina nos níveis de TNF- α em córtex frontal e hipocampo de ratos Wistar administrados com βA_{1-42}	53
Figura 11: Efeito do lítio (5mg/kg), memantina (5mg/kg) ou associação de lítio e memantina nos níveis da citocina IL-4 em córtex frontal e hipocampo de ratos Wistar administrados com βA_{1-42}	54
Figura 12: Efeito do lítio (5mg/kg), memantina (5mg/kg) ou associação de lítio e memantina no conteúdo proteico de proteínas de sinalização de inflamação TLR2 e NLRP3 no hipocampo de ratos Wistar administrados com oligômeros βA_{1-42}	55

Lista de tabelas

Tabela 1 – Grupos experimentais de acordo com o tratamento.....	38
---	----

Lista de abreviaturas

ABI3 - (do inglês, *abscisic acid insensitive 3*);

ACSF - Líquido cefalorraquidiano artificial (do inglês, *artificial cerebrospinal fluid*);

ANOVA - Análise de variância (do inglês, *analysis of variance*);

ANVISA - Agência nacional da vigilância sanitária;

APP - Proteína precursora amiloide (do inglês, *amyloid precursor protein*);

BDNF - Fator Neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês, *brain derived neurotrophic factor*);

BHE – Barreira hematoencefálica;

C83 - Carbono-terminal do aminoácido 83;

C99 - Carbono-terminal do aminoácido 99;

Ca²⁺ - Cálcio;

CAT – Catalase;

CEUA Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais;

CONCEA Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal;

COX-2 Ciclooxygenase-2;

DA - Doença de Alzheimer;

DAMPs - Padrões moleculares associados à danos (do inglês, *damage-associated molecular pattern molecules*)

EROs - Espécies reativas de oxigênio;

FDA - *Food and Drug Administration*;

GPx - Glutathione peroxidase;

GR - Glutathione reductase;

GSK3β - Glicogênio sintase cinase 3β (do inglês *Glycogen synthase kinase-3β*);

i.c.v.- Intracerebroventricular;

i.h. - Intrahipocampal;

IL-10 - Interleucina 10;

IL-12 - Interleucina 12;

IL-13 - Interleucina 13;

IL-17 - Interleucina 17;

IL-1 β - Interleucina 1 β ;

IL-4 - Interleucina 4;

IL-6 - Interleucina 6;

iNOS - óxido nítrico sintase induzível (do inglês, *nitric oxide synthase*);

LCR - Líquido cefalorraquidiano;

LPS – Lipopolissacarídeo;

LTP - Potencial de longa duração (do inglês, *long-term potentiation*);

MDA – malondialdeído;

MYD88 - Fator de diferenciação mieloide 88 (do inglês, *myeloid differentiation primary response gene 88*);

NF- κ B - Fator nuclear kappa B (do inglês, *nuclear factor kappa B*);

NLRP3 - do inglês, *oligomerization domain-like receptor family pyrine domain-containing 3*;

NMDA - N-Metil-D-Aspartato;

NO – Óxido nítrico;

PAMPs - Padrões moleculares associados aos patógenos (do inglês, *pathogen-associated molecular pattern*);

PLCG2 - (do inglês, *Phospholipase C Gamma 2*);

PPAR γ - receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ ;

PRRs - receptores de reconhecimento de padrões (do inglês, *pattern recognition receptors*);

PSEN1 - Presenilina 1;

PSEN2 - Presenilina 2;

sAPP α - Proteína precursora amiloide- α secretada (do inglês, *secreted amyloid precursor protein- α*);

sAPP β - Proteína precursora amiloide- β secretada, (do inglês, *secreted amyloid precursor protein- β*);

SNC – Sistema nervoso central;

SOD - Superóxido dismutase;

TLR2 – receptores toll-like 2 (do inglês, *toll-like receptor 2*);

TLR4 – receptores toll-like 4 (do inglês, *toll-like receptor 4*);

TLR6 – receptores toll-like 6 (do inglês, *toll-like receptor 6*);

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α (do inglês, *tumor necrosis factor- α*)

TREM2 - (do inglês, *Triggering receptor expressed on myeloid 2*);

β A - beta-amiloide;

Sumário

1. Introdução.....	223
1.1 Doença de Alzheimer	23
1.2 Fisiopatologia da DA	24
1.3 Neuroinflamação na DA.....	29
1.4 O uso de lítio associado à memantina como uma possível intervenção na DA	32
1.5 Justificativa	36
2. Objetivos	37
2.1 Objetivo geral.....	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
3. Materiais e métodos	39
3.1 Animais	39
3.2 Cirurgia estereotáxica para indução do modelo.....	39
3.3 Tratamento e protocolo experimental.....	40
3.4 Testes comportamentais	42
3.4.1 Labirinto octogonal	42
3.4.2 Campo aberto	43
3.5 Eutanásia e dissecação de estruturas cerebrais.....	43
3.6 Análises Imunoquímicas	44
3.6.1 Imunoensaio enzimático.....	44
3.6.2 Imunodeteção por western blot.....	44
3.7 Análise estatística	45
4. Resultados	47
5. Discussão	57
6. Conclusão	67
Referências.....	69
ANEXO A - Aprovação da comissão de ética no uso de animais ...	93

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Alzheimer

O envelhecimento está associado ao declínio das funções cognitivas (Gold et al., 2017), e considera-se que a Doença de Alzheimer (DA) é o tipo mais comum de demência no mundo associada ao envelhecimento. Em 2010, estimava-se que cerca de 35,6 milhões de pessoas no mundo estariam afetadas pela DA, e atualmente a doença acomete cerca de 35 bilhões de idosos no mundo (Yi et al., 2017). A estimativa é que este número aumentará para 60,7 milhões em 2030 e 115,4 milhões em 2050 (Cumming e Brodtmann, 2010). O processo fisiológico é caracterizado por um declínio progressivo das funções cognitivas e de memória, resultante da perda sináptica e celular, acompanhada por uma forte resposta neuroinflamatória (Madeira et al., 2015; Fakhoury, 2017). Além de diminuição acentuada de neurônios, ocasionando uma forte atrofia neuronal e redução de fibras mielínicas (Sun et al., 2015; Garcia-Esparcia et al., 2017). Os sintomas cognitivos mais comuns incluem déficit de memória de curto e longo prazo e disfunções visuoespaciais (Apostolova, 2016).

A etiologia da doença ainda não está totalmente elucidada, mas sabe-se que múltiplos fatores ambientais e genéticos estão envolvidos como: idade, sexo, histórico familiar, educação, depressão, hipertensão, diabetes, hiperlipidemia, baixa atividade física e cognitiva, hábitos de vida e medicamentos (Schipper, 2011). Vários genes foram relacionados ao desenvolvimento e progressão da DA, incluindo o gene da apolipoproteína E (ApoE), mutação na proteína precursora amiloide, do inglês “amyloid precursor protein” (APP), e na presenilina 1 (PSEN1) ou na presenilina 2 (PSEN2). Outros processos biológicos que tem sido associados ao desenvolvimento de DA são: o estresse oxidativo, alterações metabólicas e resistência à insulina (Guo et al., 2015). Além da neuroinflamação, que vem surgindo como um importante fator para o desenvolvimento e progressão da DA. Um estudo recente identificou três novas alterações genômicas microgliais relacionadas com a DA, a *PLCG2* (do inglês, *Phospholipase C Gamma 2*), *ABI3* (do inglês, *abscisic acid insensitive 3*), e *TREM2* (do inglês, *Triggering receptor expressed on myeloid 2*), mostrando que a resposta imune microglial contribui para o desenvolvimento da DA (Sims e van der Lee, 2017).

1.2 Fisiopatologia da DA

As principais características histopatológicas encontradas na DA são o acúmulo do peptídeo β -amilóide (β A) pela cascata amilodoigênica e os emaranhados neurofibrilares (Yu et al., 2015). O peptídeo β A é derivado da APP, enquanto os emaranhados neurofibrilares são compostos por estruturas intraneuronais da proteína tau hiperfosforilada (Ikram et al., 2017). A APP é uma proteína transmembranar altamente expressa em tecidos neuronais humanos. Essa proteína sofre uma clivagem complexa por α - ou β -secretases que iniciam duas vias diferentes, via não amilodoigênica e via amilodoigênica, respectivamente. Quando APP é clivada pela α -secretase, forma um fragmento extracelular solúvel, sAPP α , sem toxicidade. Quando APP é clivada por β -secretase, gera um fragmento solúvel extracelular, sAPP β , e um fragmento carboxi-terminal CTF99. Este último é ainda clivado pela ação da γ -secretase formando um fragmento β A₄₀₋₄₂ chamado de peptídeo β A. Assim, a formação de β A requer a clivagem pela pelas secretases β e γ (Ezeani e Omabe, 2015) (Figura 1). Depois de liberado, os peptídeos β A são considerados a principal razão para a neurotoxicidade (Barage e Sonawane, 2015; Puzzo et al., 2015). O peptídeo β A tende a se agregar formando oligômeros e protofibrilas que posteriormente se agregam dando origem as fibrilas, as quais compõe as placas senis (Lasagna-Reeves et al., 2011; Heppner et al., 2015).

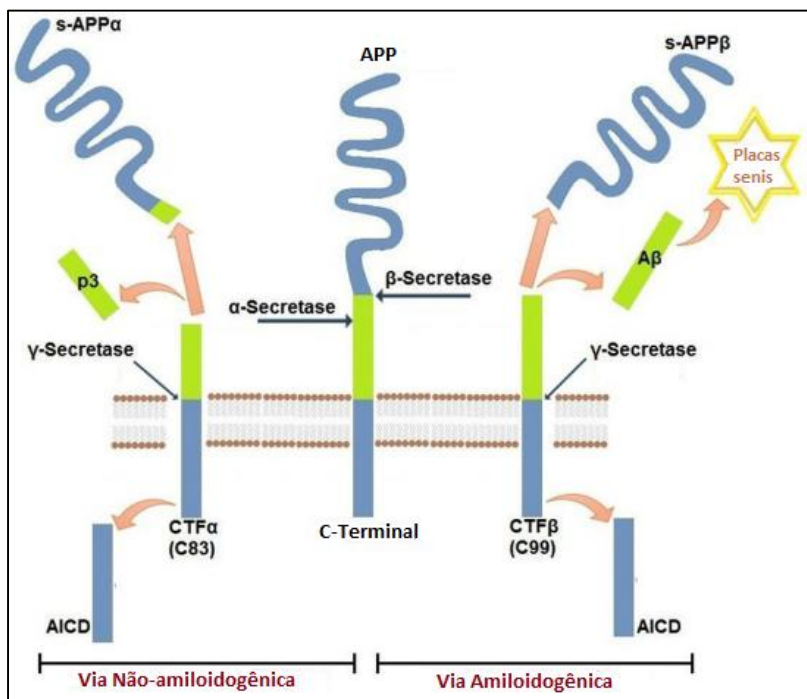


Figura 1: Representação esquemática do processamento de APP. Na via não-amiloidogênica, a enzima α -secretase cliva a APP dentro do domínio β A levando a produção de um domínio solúvel de APP, sAPP α , e um fragmento C-terminal C83 ancorado à membrana. A ação subsequente de γ -secretase libera dois peptídeos intracelulares APP: domínio (AICD) e P3. Na via amiloidogênica, a enzima β -secretase cliva APP liberando o sAPP β solúvel e um fragmento C-terminal (C99), que é por sua vez clivado por γ -secretase formando o β A. Fonte: Adaptado de Canobbio et al. (2015).

Evidências sugerem que peptídeos β A podem causar desequilíbrio na homeostase de cálcio (Ca^{++}) e disfunção na sinalização de glutamato (Ezeani e Omabe, 2015). A sinalização do Ca^{++} é importante para plasticidade e sobrevivência neuronal, controle da excitabilidade da membrana para liberação de neurotransmissores, crescimento neuronal, diferenciação e apoptose. No entanto, elevados níveis de Ca^{++} podem levar a ativação de vias apoptóticas, neurotoxicidade e disfunções no retículo endoplasmático (Berridge et al., 1998; Bezprozvanny e Mattson, 2008; Moreno-Ortega et al., 2015). Sendo assim, estudos comprovam que o aumento dos níveis de β A aumentam a vulnerabilidade à excitotoxicidade

por Ca^{++} intracelular (Allen et al., 2013), por causar disfunção e alterações de proteínas que compõe as membranas celulares (Ayyalasomayajula e Suresh, 2017). Também já foi observado que animais transgênicos para APP tem aumento da neurotoxicidade por βA com envolvimento de Ca^{++} (Meyer-Luehmann et al., 2008).

A sinalização de glutamato participa nos processos de memória e aprendizado, e a disfunção na sinalização de glutamato pelo receptor NMDA tem sido associado ao dano cognitivo observado em pacientes DA (Danysz e Parsons, 2012). Estudos tem documentado que peptídeos βA causam uma superestimulação e desregulação dos canais NMDA, levando a neurotoxicidade por glutamato (Shankar et al., 2007; Decker et al., 2010; Paula-Lima et al., 2011). Em cultura de células hipocampais, observou-se que a incubação com peptídeo βA foi capaz de desbloquear a ligação de magnésio (Mg^{+2}) no canal NMDA, aumentando o influxo de Ca^{++} e causando excitotoxicidade por glutamato (Brorson et al., 1995) (Figura 2). A ativação excessiva de NMDAR por oligômeros βA resulta no influxo excessivo Ca^{++} , levando ao estresse oxidativo, interrompendo a sinalização neuronal, reduzindo da plasticidade sináptica, ocasionado déficit cognitivo e diminuindo a capacidade de aprendizagem em pacientes com DA (Wenk, 2006; De Felice et al., 2014). Os oligômeros βA tem sido encontrados no líquido cefalorraquidiano (LCR) de indivíduos saudáveis e níveis aumentados em pacientes com DA (Holttä et al., 2013; Sengupta et al., 2017). Esse aumento está relacionado ao comprometimento cognitivo encontrado nos pacientes, uma vez que os oligômeros βA são tóxicos para células, interrompendo as sinapses e processos de potenciação de longa duração (LTP) (Selkoe, 2008; Lasagna-Reeves et al., 2012; Fa et al., 2016). Em culturas de células hipocampais de animais foi possível observar que diferentes doses de βA , em apenas 20 minutos de exposição, foram capazes de diminuir a LTP, mostrando que os oligômeros estão diretamente relacionado ao comprometimento cognitivo na DA (Fa et al., 2016). Em modelos animais da doença de Alzheimer, foi possível observar que uma única administração de oligômeros β -amilóide $_{1-42}$ causou dano cognitivo por 14 dias nas tarefas no reconhecimento de objetos (Fukumoto et al., 2014), em ratos Wistar os animais que receberam $\text{O}\beta\text{A}_{1-40}$ tiveram uma latência maior para encontrar a plataforma no Labirinto de Morris, 14 dias após da administração do peptídeo (Mehdizadeh M et al., 2017). Em camundongos Balb C uma única dose de $\text{A}\beta_{1-42}$ causou dano cognitivo após 18 dias, observado no teste do Labirinto Octagonal e de Y, onde os animais tiveram um desempenho menor em comparação aos animais controle (Garcez ML et al., 2016).

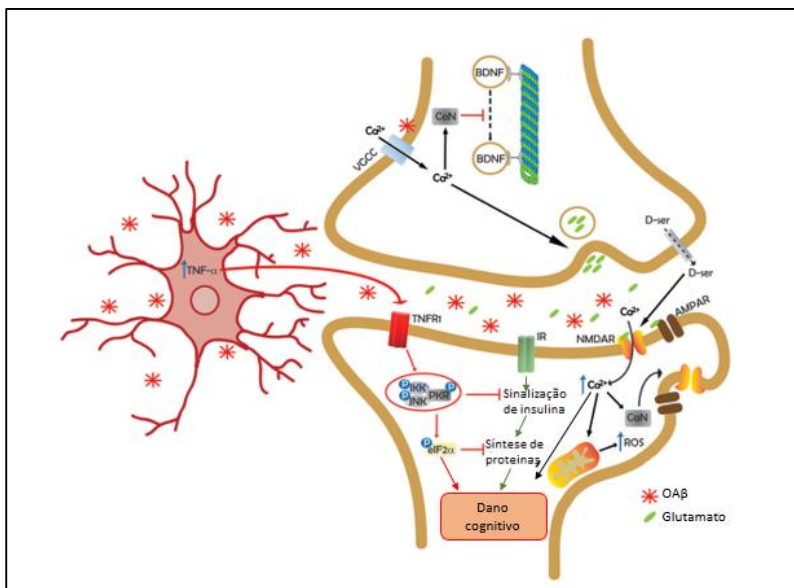


Figura 2: Sinalização do βA no receptor NMDA. Na de DA o βA estimula canais de cálcio (Ca^{++}) no neurônio pré-sináptico. O influxo de Ca^{++} para dentro da célula, ativa a calcineurina, e abre as vesículas sinápticas para liberação de glutamato na fenda sináptica. O glutamato na fenda sináptica liga-se ao seu receptor NMDA, assim como os oligômeros βA (βA) também estimulam o receptor NMDA, aumentando o influxo de cálcio no neurônio pós-sináptico. O aumento de cálcio intracelular, causa aumento de estresse oxidativo, distúrbios mitocondriais, entre outras vias, que levam ao dano cognitivo. Por outro lado, a microglia ativada pelos O βA , secreta citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , que se liga ao seu receptor (TNFR1), ativando a via da JNK, que inibe a fosforilação do receptor de insulina em tirosina, que se autofosforila em serina. A fosforilação do receptor de insulina em serina, inibe síntese proteicas, que auxilia no dano cognitivo. Adaptado de Ferreira et al. (2015).

O estresse oxidativo também pode ser induzido por oligômero βA . Recentes estudos vêm demonstrando que espécies reativas de oxigênio (EROS) danificam macromoléculas, tais como lipídios e proteínas em várias regiões do cérebro de ratos e provocam alterações na sua estrutura e função (Moslemnezhad et al., 2016). Em culturas primárias de hipocampo de rato, houve um aumento de radical hidroxila OH^{\cdot} , ânion

superóxido $O_2^{\cdot -}$, malondialdeído (MDA), inibição da atividade da superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPX), após incubação de 0,5 $\mu\text{mol/L}$ de βA (Tan et al., 2017). Em animais transgênicos APPswe/PS1dE9, foi demonstrado aumento de MDA (malondialdeído) e diminuição de SOD e SOD-Mn, e aumento de citocinas interleucina-6 (IL-6) e IL-1 β (Wang et al., 2016b). Tem sido demonstrado que os produtos de oxidação de proteínas e a peroxidação lipídica estão elevados em pacientes com DA. Além disso, no cérebro de pacientes com DA, ocorre a diminuição da expressão das enzimas antioxidantes (Choi et al., 2012), evidenciando que os oligômeros βA aumentam os níveis de estresse oxidativo. Resultados de Casado (2008) observaram uma diminuição da atividade SOD, catalase (CAT), GPx, glutatona redutase (GR) e aumento nos níveis de MDA em pacientes com DA (Casado et al., 2008). Um recente estudo observou carbonilação de proteínas nas fases iniciais de pacientes com DA, mostrando a relação do estresse oxidativo com a progressão da doença (Di Domenico et al., 2016). O acúmulo do peptídeo βA , disfunção mitocondrial e diminuição do aporte energético tem sido relatada nas fases iniciais de pacientes com DA (Radi et al., 2014). Em modelo animal transgênico para DA foi visto aumento dos níveis de EROS, disfunção mitocondrial nas fases iniciais da doença (Fang et al., 2016). Outro estudo também mostrou que em modelo animal de DA induzido pela administração de estreptozotocina, ocorreu aumento dos níveis de MDA, diminuição da atividade das enzimas SOD e CAT (Hassanzadeh et al., 2015). Além desses processos citados, estudos mostram que alterações bioquímicas tais como disfunções energéticas e mitocondriais, neuroinflamação, desregulação da resposta imune e da membrana lipídica, perda sináptica e de neurotransmissores contribuem para a progressão da DA (Yi et al., 2017).

Outra característica histopatológica da DA é a deposição de emaranhados neurofibrilares dentro dos neurônios (Sims e van der Lee, 2017). Estes feixes de proteínas anormais são depósitos helicoidais de proteína tau hiperfosforilada em forma de chama. Sob condições fisiológicas normais, a fosforilação da proteína tau ajuda a manter a estrutura do citoesqueleto (Niemantsverdriet et al., 2017). O saldo de tau fosforilada e não fosforilada regula a estabilidade dos microtúbulos no citoesqueleto, que atuam na manutenção do citoesqueleto e transporte intracelular (Goedert et al., 2006; Saura et al., 2015). Na DA, existe um desequilíbrio entre a fosforilação por proteínas quinases e defosforilação por fosfatases da proteína tau, conduzindo a fosforilação excessiva da tau, instabilidade do microtúbulo e, conseqüentemente, morte celular (Saura et al., 2015). Durante a neurodegeneração, a tau na forma fosforilada é

liberada no espaço intracelular, após o rompimento dos microtúbulos, resultando no aumento da concentração da proteína em pacientes com DA (Niemantsverdriet et al., 2017). A proteína tau hiperfosforilada se acumula no interior da célula, formando os emaranhados neurofibrilares visto em pacientes com DA (Grove et al.; Hardy e Selkoe, 2002). A formação das placas senis e dos emaranhados neurofibrilares causam degeneração dos neurônios e alteração nas sinapses (Savva et al., 2009; Jack e Holtzman, 2013). Assim, os pacientes com DA apresentam déficit cognitivo com diminuição na retenção de memória, atrofia cerebral e alterações metabólicas (Hohman et al., 2017; Liu et al., 2017a; Nakamura e Cuesta, 2017; Yanagida et al., 2017).

1.3 Neuroinflamação na DA

A neuroinflamação é definida como a ativação do sistema imune inato cerebral, e a sua principal função consiste em proteger o sistema nervoso central (SNC) contra insultos infecciosos, lesões ou doenças (Spencer et al., 2012). A resposta inflamatória do cérebro é complexa e pode ter um papel fundamental em várias doenças do SNC (Mrak, 2009; Bagyinszky et al., 2017). Atualmente tem sido bem estabelecido que a neuroinflamação está ativamente envolvida em doenças neurológicas assim como a DA (Hensley, 2010; Zhang e Jiang, 2015). Estudos mostram que no soro de pacientes com DA há um aumento de IL-10, IL-1 β e IL-17 (D'Anna et al., 2017). Esta hipótese implica em um estímulo inflamatório inicial (causado pelos oligômeros de β A) que causam a ativação da micróglia e da resposta inflamatória. Uma vez que é ativada, a micróglia secreta várias citocinas pró-inflamatórias (incluindo: IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e quimiocinas (incluindo: CCL2 / 4/ 11) recrutando mais micróglias e astrócitos para a local da inflamação. Sob circunstâncias normais, este processo é controlado pelas células imunes que são recrutadas para o local da inflamação e facilitam a remoção do estímulo/patógeno levando a resolução da resposta inflamatória. Porém, a produção excessiva de β A e hiperfosforilação da tau desregula este mecanismo de “limpeza” imunológico (Heneka et al., 2013; Heneka et al., 2015b; D'Anna et al., 2017).

A ativação da micróglia é dividida em dois fenótipos, o tipo M1 e M2, de acordo com seu estímulo e resposta. O fenótipo M1 tem natureza pró-inflamatória, com liberação de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e regulação de CD16, CD32, CD64, CD86. Enquanto que o fenótipo M2 está relacionado à liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, IL-4, IL-13, além

de CD206 e TREM2 (Lee e Suk, 2017)). Atualmente, a existência desse fenótipo M1 e M2 tem sido questionada. Autores sugerem que não há diferenciação entre os fenótipos M1 e M2, uma vez que a micróglia encontra-se ativada (Ransohoff, 2016). De qualquer forma, sabe-se que a micróglia pode apresentar respostas divergentes, que podem ser benéficas como a fagocitose de restos celulares e fragmentos β A, induzindo a resolução da resposta inflamatória, ou contribuir para a neuroinflamação crônica, causando ainda mais danos e contribuindo para progressão da DA (Heneka et al., 2014).

Células microgliais expressam receptores de reconhecimento padrão (do inglês, *pattern recognition receptors* - PRRs) que podem detectar e responder a padrões moleculares associados a danos (do inglês, *damage-associated molecular pattern molecules* - DAMPS) e padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, *pathogen-associated molecular pattern* - PAMPs). Tais PRRs incluem CD36, CD14 e receptores Toll-like 2 (TLR2), TLR4, TLR6. Com a sobrecarga de β A no cérebro, pode ocorrer a ativação do receptor TLR2, ativando a micróglia no SNC ativando uma resposta imune inata (Heneka, 2017). A ligação de CD36, TLR2, TLR4 e TLR6 leva a transdução do sinal pró-inflamatório através da ativação da proteína mieloide de resposta primária 88 (do inglês, *myeloid differentiation primary response gene 88* - MyD88), que leva a ativação do fator nuclear kappa B (do inglês, *nuclear factor kappa B* - NF- κ B), como exemplificado na figura 3.

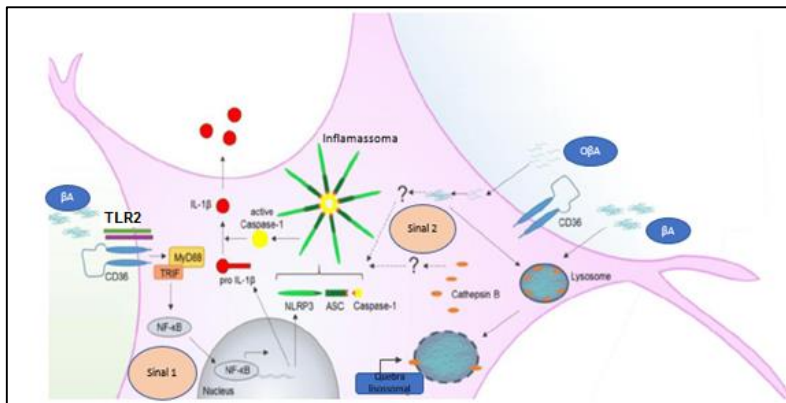


Figura 3: Ativação do inflamassoma NLRP3 por β A. Os oligômeros β A e placas de β A causam a ativação de células microgliais pela ativação de receptores TLR, promovendo o sinal 1 através da ativação do fator de transcrição NF- κ B para síntese de NLRP3 e pró-IL-1 β . O sinal 2 pode ser ativado pela agregação intracelular de β A solúvel ou por ruptura lisossomal causada pela sobrecarga de β A. Ambos os eventos, sinal 1 e 2, levam à formação do NLRP3 ativo. Ativação de caspase-1 do inflamassoma NLRP3, cliva a pró-IL-1 β em IL-1 β madura, que é então liberada para o espaço extracelular. Adaptado de Gold e El Khoury (2015).

Quando ocorre a ativação de NF- κ B concomitantemente com a fagocitose, ocorre dano e rompimento lisossomal, já que os fragmentos β A não são completamente degradados no lisossomo, isso leva a montagem do inflamassoma NLRP3, do inglês *oligomerization domain-like receptor family pyrine domain-containing 3*, o qual consiste em um complexo de proteínas que inclui caspase -1. Este é ativado em resposta a uma variedade de estímulos, tais como, influxo de potássio e cálcio, geração de espécie reativas ao oxigênio, dano e liberação do DNA mitocondrial, e liberação de cathepsina no citosol, após o dano lisossomal (Sutterwala et al., 2014; Guo et al., 2015; Vanaja et al., 2015). O inflamassoma NLRP3 gera a forma madura de citocinas IL-1 β e IL-18 através da ativação de caspase-1, que conduz a clivagem de pró-IL-1 β à sua forma madura IL-1 β , a qual é liberada para o meio extracelular (Guo et al., 2015).

A ativação do inflamassoma NLRP3 foi detectada várias doenças neurodegenerativas, incluindo a DA e esclerose lateral amiotrófica (Heneka et al., 2014; Heneka et al., 2015b). Em culturas de astrócitos ativados por LPS e tratados com β A houve um aumento dos níveis de pró-IL-1 β após ativação de NLRP3 (Couturier et al., 2016). Outro estudo

mostra aumento significativo de caspase-1 em pacientes com comprometimento cognitivo moderado e em animais APP/PS1 consistente com aumento do inflamassoma NLRP3 (Heneka et al., 2013; Heneka, 2017). Os autores desses estudos, sugerem que a ativação de caspase-1 e NLRP3 tem um papel fundamental e importante na fisiopatologia do DA, e que a inibição de NLRP3 representa uma nova intervenção terapêutica para esta doença.

Outro mecanismo fisiopatológico da DA envolve a atividade exacerbada da enzima GSK-3 β , uma serina/treonina cinase. Consequentemente sua inibição reduz a formação das placas amiloides e emaranhados neurofibrilares presentes na DA (Phiel et al., 2003). A GSK-3 β está intimamente envolvida na hiperfosforilação da tau, no aumento da produção de β A através de sua ação na enzima γ -secretase, nas respostas inflamatórias e diminuição da memória (Hooper et al., 2008). Além disso, regula a produção mediada pelos receptores TLRs e produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (Wang et al., 2011a). Estes dados possibilitam identificar que os inibidores da GSK-3 β podem tornar-se novas abordagens terapêuticas promissoras e eficazes para o tratamento da DA.

1.4 O uso de lítio associado à memantina como uma possível intervenção na DA

A DA é a forma mais comum de demência, sendo conhecida a cerca de um século, porém até o momento, não há nenhum tratamento que leve a cura da doença. O tratamento medicamentoso disponível atualmente é apenas paliativo, ou seja, atua na prevenção do agravamento dos sintomas (Ramirez-Bermudez, 2012). Até o momento os únicos fármacos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) e Agência nacional da vigilância sanitária (ANVISA) são quatro inibidores da enzima acetilcolinesterase: tacrina, donepezil, rivastigmina e galantamina, que são medicamentos utilizados para aumentar a concentração de acetilcolina na fenda sináptica visando melhorar a cognição. Apesar de serem amplamente prescritas, essas drogas têm apenas efeitos sintomáticos limitados e transitórios quando comparados com o placebo, sem um impacto definitivo no processo neurodegenerativo de longo prazo (Stella et al., 2015). E outra classe são os antagonistas de receptores NMDA, tendo como representante apenas a memantina, que visa reduzir a excitotoxicidade glutamatérgica. Porém, estes medicamentos pouco melhoram a função cognitiva e não são capazes de evitar o desfecho da doença ou a sua evolução (Schmidt et al., 2015).

A memantina é um antagonista não competitivo de receptores NMDA de glutamato, aprovado na União Européia, nos Estados Unidos e no Brasil para o tratamento de pacientes com DA de moderada a grave (Anand et al., 2014; Kumar et al., 2015). Porém, o efeito da memantina e o seu papel na DA não é totalmente claro. Sabe-se que a memantina protege os neurônios da excitotoxicidade glutamatérgica, reduzindo a toxicidade neuronal provocada pela excessiva ativação dos receptores NMDA e aumento do influxo de Ca^{2+} (Reisberg et al., 2003; Shah et al., 2008). Protege ainda, contra a excitotoxicidade glutamatérgica induzida pelo βA , diminuindo a hiperfosforilação da tau, por diminuição de $\text{GSK3}\beta$, pela ação na fosfatidilinositol-3-quinase, do inglês, *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase* (PI3K) (Song et al., 2008; Zadori et al., 2014).

Outros mecanismos da memantina incluem a inibição da atividade da óxido nítrico sintase induzível (do inglês, *nitric oxide synthase* – iNOS) *in vitro*, e redução do dano oxidativo e danos na memória espacial de camundongos senescentes (Ota et al., 2015). Além disso, foi observada a redução da hiperfosforilação da tau (Li et al., 2004; Lanctot et al., 2009) e redução de βA_{1-42} e βA_{1-40} em cultura de neuroblastoma humano, em cultura de células corticais de ratos e em camundongos transgênicos APP/PS1 (Alley et al., 2010). Em ratos wistar a memantina também reduziu a ativação de astrócitos e de células microgliais (Arif et al., 2009), indicando que a memantina possui propriedades contra neuroinflamação induzida pelo βA .

Em pacientes foi demonstrado que o tratamento com memantina melhora a cognição quando avaliada através do Mini Exame do Estado Mental, Escore de Atividade de Vida Diária”, e “Escala da Função Global”, sendo estes, os testes mais utilizados para o diagnóstico e classificação dos estágios da DA (Bakchine e Loft, 2008; Rainer et al., 2011). Além da vantagem de ser um tratamento bem tolerado, mesmo quando utilizado por longos períodos, pois apresenta poucos efeitos adversos (Grossberg et al., 2013). A utilização da memantina é clinicamente significativa em estágios moderados e severos da DA, porém pouco observável em estágios leves (McShane et al., 2006; Wilkinson e Andersen, 2007; Schmidt et al., 2008). Entretanto, o tratamento com memantina não consegue evitar a progressão nem o desfecho da DA. A busca de novos medicamentos que sozinhos ou associados aos tratamentos existentes possam alcançar esses objetivos é necessária.

Os sais de lítio têm sido extensivamente usados nas últimas décadas como estabilizador de humor para o tratamento de desordem bipolar (Miklowitz e Johnson, 2006). Porém o lítio parece ter outros efeitos terapêuticos, entre eles, destaca-se o efeito neuroprotetor, dessa forma, podendo ser útil para o tratamento de doenças neurodegenerativas (Rowe e Chuang, 2004; Vo et al., 2015). Assim, o lítio, surge como uma possível alternativa terapêutica para DA. Uma vez que, estudos clínicos vêm demonstrando que o lítio pode evitar a progressão dos danos cognitivos observados em pacientes com DA em estágio leve e moderado (Leyhe et al., 2009; Forlenza et al., 2011), e reduzir a incidência da DA em pacientes com transtorno bipolar (Sallaberry et al., 2013). Além de diminuir significativamente a proteína tau fosforilada no LCR de pacientes com DA (Forlenza et al., 2011).

Os mecanismos pelo qual o lítio exerce ação neuroprotetora ainda não estão elucidados. Sabe-se que o lítio pode inibir especificamente a atividade da GSK-3 β (Mudireddy et al., 2014; Wilson et al., 2017). Essa enzima é relacionada principalmente a hiperfosforilação da tau, a qual leva a desestabilização dos microtúbulos e perda da integridade axonal observada na DA, podendo este ser um mecanismo importante para o efeito terapêutico do lítio na doença. Foi demonstrado que o lítio reduziu a fosforilação da tau ocasionada por injeção intracerebroventricular de βA_{1-42} em peixes da espécie “zebra fish” (Nery et al., 2014), além de reduzir a atividade da GSK-3 β e fosforilação da tau *in vitro* e *in vivo* em camundongos senescentes (Tajes et al., 2008).

Outros possíveis mecanismos terapêuticos do lítio na DA incluem a diminuição da produção de βA_{1-42} , observada em córtex de camundongos transgênicos (Rockenstein et al., 2007), e também no sistema nervoso de moscas *Drosophila* (Sofola-Adesakin et al., 2014). Em animais transgênicos para DA (3xTg-DA) o tratamento com lítio foi capaz de induzir a neurogênese por aumentar o número de células piramidais na região CA1 do hipocampo (Schaeffer et al., 2017). Um estudo em ratos para avaliar o efeito do lítio na memória de longa duração, observou que após o tratamento com lítio na dose de 0,125 mg/kg houve um aumento da fosfolipase C e melhora cognitiva nos animais (Mury et al., 2016). Sub-doses de lítio (0,25mg/kg) diminuíram as placas senis, a perda neuronal no córtex e no hipocampo e aumentaram os níveis de Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (do inglês, *brain derived neurotrophic fator* – BDNF) no hipocampo em modelo animal de DA (Nunes et al., 2015). Em culturas de células, a incubação de lítio nas doses 0,02mM e 0,2mM, aumentou a expressão de células neuronais no córtex

e no hipocampo, aumentando também a expressão de BDNF (De-Paula et al., 2016).

O lítio apresenta efeitos também contra neuroinflamação. Foi demonstrado que o tratamento com lítio reduziu a atividade da fosfolipase A2, além de níveis de prostaglandinas e tromboxanos em modelo de neuroinflamação em ratos (Basselin et al., 2007). Além disso, reduziu os níveis de TNF- α , IL -1 β e NF- κ B e a expressão de receptores TLR4 em modelo de neuroinflamação em ratos idosos (Lu et al., 2015), o tratamento com lítio também reduziu a ativação da micróglia *in vitro* (Davenport et al., 2010). Segundo Nassar (2014), o lítio inibe GSK-3 β , resultando na diminuição da atividade de NF- κ B. A redução da atividade de NF- κ B (translocação de p65-p50 para o núcleo e estimulação de sua atividade transcricional) leva à expressão atenuada de mediadores e enzimas associadas a inflamação. A inibição de GSK-3 β pelo lítio afeta outras vias *downstream* (de GSK-3 β), como STAT, o que também resulta na supressão da inflamação (Nassar, 2014). As propriedades anti-inflamatórias do lítio começaram a surgir em meados de 1970, ao observarem que o lítio é capaz de inibir a síntese de prostaglandinas (Karmazyn et al., 1978), e reduzir a produção de mediadores pró-inflamatórios induzidos por LPS (Basselin et al., 2007; Nahman et al., 2012). Além disso, o tratamento crônico com lítio pode atenuar a produção de ácido araquidônico, uma característica marcante da resposta inflamatória inata (Basselin, 2007).

Esses efeitos são importantes para o tratamento da DA, já que, crescentes evidências demonstram que a neuroinflamação tem um papel chave na fisiopatologia da doença. O uso do lítio em pacientes com demência já vem sendo estudado, os resultados clínicos destacam os benefícios do lítio na prevenção da demência em pacientes com transtornos de humor e comprometimento cognitivo leve, sugerindo que o tratamento com lítio pode ter efeito benéfico em doenças neurodegenerativas, incluindo a DA, principalmente se o tratamento for iniciado em fases iniciais (Forlenza et al., 2011; Forlenza et al., 2014; Mauer et al., 2014). A memantina já é aprovado para DA, sendo este fármaco seguro e eficaz em retardar a progressão da capacidade cognitiva e funcional dos pacientes (Schmidt et al., 2015), porém como monoterapia não é capaz de evitar a progressão e o desfecho da doença. Portanto o objetivo do presente projeto é associar o tratamento de lítio com memantina, uma vez que não há nenhum estudo até o presente momento que tenha testado essa associação. Assim, espera-se que esses fármacos apresentem sinergismo.

1.5 Justificativa

Com o aumento da expectativa de vida da população está ocorrendo um grande aumento da incidência de doenças neurodegenerativas, tais como, a DA, que é a principal causa de demência em indivíduos idosos. O aumento da prevalência da DA gera uma sobrecarga no sistema de saúde, uma vez que a previsão para os próximos anos é de que população idosa se equipare em números a população jovem. O indivíduo com DA torna-se completamente dependente de cuidadores e familiares, devido ao declínio de funções cognitivas, que levam a perda da independência, já que o paciente não consegue exercer tarefas simples diárias, o que gera grandes custos e sofrimento aos pacientes e familiares. Atualmente não há fármacos que possam reverter ou evitar a progressão da DA, e ainda, o efeito benéfico da medicação é pouco observável em alguns pacientes, assim, é imprescindível a procura de novos tratamentos que possam melhorar a qualidade de vida ou evitar a progressão da doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito do lítio, memantina e associação de lítio e memantina na memória e na neuroinflamação em um modelo animal de demência do tipo DA induzido pela administração intrahipocampal do oligômeros βA_{1-42} .

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a memória de habituação pelo teste de campo aberto em ratos tratados com lítio, memantina e associação de lítio e memantina em um modelo animal de demência do tipo DA induzido pela administração intrahipocampal de oligômeros βA_{1-42} ;
- Avaliar a memória espacial pelo teste de labirinto octagonal, em ratos tratados com lítio, memantina e associação de lítio e memantina em um modelo animal de demência do tipo DA induzido pela administração intrahipocampal de oligômeros βA_{1-42} ;
- Avaliar a memória de trabalho pelo teste de labirinto octagonal em ratos tratados com lítio, memantina e associação de lítio e memantina em um modelo animal de demência do tipo DA induzido pela administração intrahipocampal de oligômeros βA_{1-42} ;
- Avaliar os níveis de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-4) em córtex frontal e hipocampo de ratos tratados com lítio, memantina e associação de lítio e memantina em um modelo animal de demência do tipo DA induzido pela administração intrahipocampal de oligômeros βA_{1-42} ;
- Avaliar o conteúdo de TLR2 e NLRP3 no hipocampo de ratos tratados com lítio, memantina e associação de lítio e memantina em um modelo animal de demência do tipo DA induzido pela administração intrahipocampal de oligômeros βA_{1-42} ;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 160 ratos Wistar machos adultos pesando em média 280g à 380g. Os animais foram obtidos do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e mantidos em gaiolas em ciclo claro/escuro de 12h, com alimentação e água, disponíveis, com temperatura entre $22 \pm 1^\circ \text{C}$.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA): Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA e Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) experimentais UNESC sob protocolo 024/2015-1.

3.2 Cirurgia estereotáxica para indução do modelo

O peptídeo βA_{1-42} (Tocris Bioscience, Bristol, UK) foi dissolvido numa solução de tampão fosfato (NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,5) na concentração de $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. A solução foi incubada durante 7 dias em estufa a 37°C e 5% de CO_2 para permitir a agregação dos peptídeos βA_{1-42} em oligômeros (Ueda et al., 1994; Resende et al., 2008; Ruiz-Muñoz et al., 2011). Os ratos Wistar machos adultos (100-120 dias) foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal e colocados no aparelho estereotáxico. Foi realizado uma incisão na pele da cabeça do animal de aproximadamente 1 cm, para expor a calota craniana. Posteriormente, foi realizado uma leve raspagem com peróxido de hidrogênio 10V para visualização do bregma, o qual a partir deste, foram executadas as medidas para localização do hipocampo. Foi utilizado uma broca carbide cirúrgica para perfuração do crânio do animal. Foi administrado 2 uL de βA_{1-42} (100 pmol/ μL) bilateralmente no hipocampo dorsal, totalizando 4 uL, ou líquido cefalorraquidiano artificial (do inglês, *artificial cerebrospinal fluid*- ACSF), através de uma cânula guia (barra incisora fixado em 1,2 mm lateral, 2,0 mm posterior ao bregma; 3,9 mm ventral) (Christensen et al., 2008).

Após o término da cirurgia os animais foram mantidos em local aquecido com um aquecedor elétrico até despertarem da anestesia. Foi

adicionado 0,2 mg/mL de dipirona sódica na água das garrafas de beber dos animais para minimizar a dor pós cirúrgica.

3.3 Tratamento e protocolo experimental

Três dias após a cirurgia e administração intrahipocampal dos oligômeros βA_{1-42} , iniciou-se o tratamento com carbonato de lítio (5 mg/kg) (Zhao et al., 2014), cloridrato de memantina (5 mg/kg) (Liu et al., 2014) ou água via oral (v.o.), por gavagem, de acordo com o grupo experimental. As doses foram escolhidas de acordo com a literatura tendo em vista a associação entre os fármacos. Ambos os medicamentos foram triturados e diluídos em água, administrados por v.o. com auxílio de uma agulha especial para gavagem e seringa, a um volume de 1 mL/kg de peso corporal do animal, durante 17 dias, aproximadamente às 10:30 horas. Os animais foram divididos em 8 grupos experimentais baseados nos tratamentos, como mostra a tabela 1 a seguir.

Tabela 1: Grupos experimentais de acordo com o tratamento

Grupos	Quantidade de animais por grupo
1. Administrados com ACSF i.h. e tratados com água v.o. (ACSF + água)	20
2. Administrados com βA_{1-42} i.h. e tratados com água v.o. (βA_{1-42} + água)	20
3. Administrados com ACSF i.h e tratados com memantina v.o. (ACSF + memantina)	20
4. Administrados com βA_{1-42} i.h. e tratados com memantina v.o (βA_{1-42} + memantina)	20
5. Administrados com ACSF i.h e tratados com lítio v.o. (ACSF+ lítio)	20
6. Administrados com βA_{1-42} i.h. e tratados com lítio v.o. (βA_{1-42} + lítio)	20

7. Administrados com ACSF i.h e tratados com lítio e memantina v.o. (ACSF + lítio + memantina)	20
8. Administrados com βA_{1-42} i.h. e tratados com lítio e memantina v.o. (βA_{1-42} + lítio + memantina)	20
TOTAL	160

Fonte: do autor.

O experimento foi dividido em duas etapas ambas utilizando o mesmo protocolo de tratamento, porém testes comportamentais distintos. Na etapa 1 (figura 4) os animais realizaram a habituação ao aparato do labirinto octogonal no 14º dia de tratamento, e nos 4 dias consecutivos (15º, 16º, 17º e 18º dias) ocorreu o teste, no último dia de teste (18º dia) foi realizada a eutanásia dos animais. A última administração dos tratamentos ocorreu 24 horas antes da eutanásia para que se pudesse avaliar o efeito subcrônico, e não agudo do tratamento.

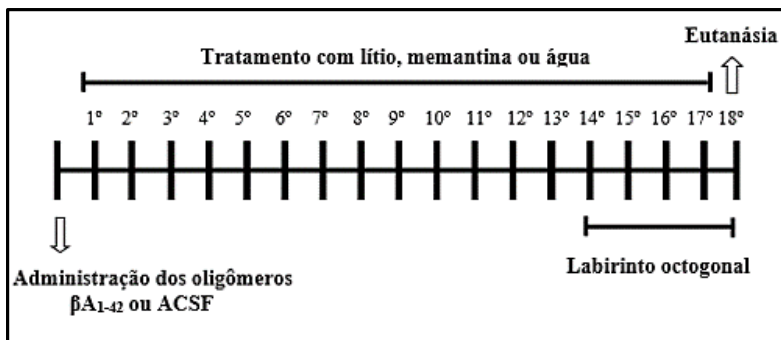


Figura 4: Protocolo experimental da etapa 1. Fonte: do autor.

Na etapa 2 (figura 5) foi realizado o teste de habituação ao campo aberto, sendo que a locomoção foi avaliada no 16º dia de tratamento, a memória de habituação, no aparato de habituação ao campo aberto, no 17º. No 18º dia foi realizada a eutanásia dos animais.

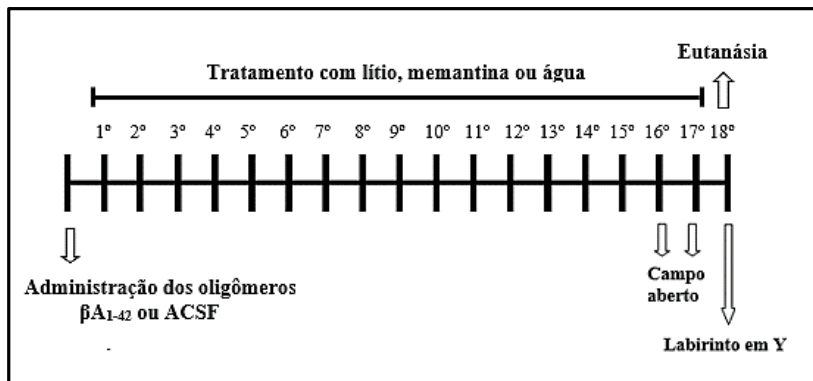


Figura 5: Protocolo experimental da etapa 2. Fonte: do autor.

3.4 Testes comportamentais

3.4.1 Labirinto octogonal

O aparato do labirinto octogonal consiste em 8 braços, numerados de 1 a 8 (48 × 12 cm), que se estende radialmente a partir de uma área central (32 cm de diâmetro). O aparelho é colocado a 50 cm acima do chão, e possui formas geométricas posicionadas na reta do braço o qual é colocada a recompensa. Esse teste é usado para avaliar a memória espacial. No primeiro dia, os ratos foram colocados um de cada vez no aparato para explorar livremente durante 5 minutos, sem recompensa, apenas para se habituarem ao equipamento. Após, retornaram a caixa moradia e foram devolvidos ao biotério com um cereal de chocolate (Nescau Cereal®) por animal em cada caixa moradia, para se habituarem a comida (recompensa), juntamente com a ração padrão do biotério, porém essa foi racionada permanecendo apenas durante duas horas disponível, para que no dia seguinte (primeiro dia de teste) os animais estivessem com fome para facilitar a realização da tarefa. No primeiro dia de teste o animal foi colocado novamente no aparato e quatro dos oito braços do labirinto possuíam a recompensa (cereal), e nestes mesmos braços as pistas geométricas. Cada animal teve 10 minutos para realizar a tarefa de encontrar a recompensa nos 4 braços, quando o animal encontrou as 4 recompensas ou passados os 10 minutos, eles foram devolvidos à caixa moradia, onde novamente foi realizado o racionamento de comida e eles foram devolvidos ao biotério. Esse procedimento foi realizado da mesma forma nos 3 dias subsequentes,

totalizando 4 dias de teste com intervalos de 24 horas. Os parâmetros avaliados foram: tempo total para encontrar a recompensa nos 4 braços; erros totais (nº de entradas) em cada braço para encontrar a recompensa; erros de trabalho (nº de entradas) em braços que a recompensa já havia sido ingerida anteriormente (memória de trabalho); e erros de referência (nº de entradas) em braços que não havia a recompensa (memória de referência) (Foyet et al., 2011; Hritcu et al., 2012). Uma hora após a finalização do teste os animais foram submetidos a eutanásia.

3.4.2 Campo aberto

O campo aberto consiste em um aparato de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 9 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual tiveram 5 minutos para explorar livremente o ambiente. Foram medidos os números de “cruzamentos” que o animal realizou através das linhas pretas da caixa, para avaliar a locomoção destes animais (Wang et al.; Salehi-Sadaghiani et al., 2012) e o número de “levantamentos” que os animais realizaram, sendo este um parâmetro de exploração. Imediatamente após, os animais voltaram para a caixa moradia. A sessão teste foi realizada 24 horas após o treino, na qual se repetiu o procedimento do treino. Os números de cruzamentos através das linhas pretas e o número de levantamentos foram contabilizados novamente para avaliar a memória de habituação dos animais 24 horas após a sessão treino (Vianna et al., 2000).

3.5 Eutanásia e dissecação de estruturas cerebrais

Após as avaliações comportamentais os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação na guilhotina e foram dissecadas as estruturas cerebrais que são mais afetadas na DA, o córtex frontal e hipocampo. A guilhotina foi lavada em água corrente entre cada eutanásia. O córtex frontal e hipocampo foram dissecados, colocadas numa caixa térmica contendo nitrogênio líquido, para congelamento imediato e foram armazenadas a -80°C para posteriores análises bioquímicas. O hipocampo e as estruturas corticais, estão associados ao processamento de memória e são as regiões mais afetadas na DA (Ramos Bernardes da Silva Filho et al., 2017), assim, essas foram as estruturas selecionadas para verificar os níveis de citocinas inflamatórias, visando relacionar a alteração desses mediadores com os danos ou proteção da memória observados no

presente estudo. Para avaliar a via de sinalização inflamatória foi selecionado o hipocampo, já que essa é a principal estrutura associada ao dano de memória espacial observado na doença (Booth et al., 2016) e foi a estrutura que apresentou maior alteração de citocinas no presente estudo.

3.6 Análises Imunoquímicas

3.6.1 Imunoensaio enzimático

As amostras de córtex frontal e hipocampo foram solubilizadas para análise dos níveis de citocinas. Foram avaliadas as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-4 por kits de imunoensaio enzimático (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), conforme as recomendações do fabricante, descritas a seguir. As placas de microtitulação (96 poços de fundo plano) foram incubadas durante a noite com o anticorpo de captura. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão fosfato de lavagem, e em seguida, foram bloqueadas com uma solução de tampão fosfato com albumina 1% durante 1 hora. Após, foram incubadas as amostras homogeneizadas e a curva padrão, diluídas em solução tampão, durante 2 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem, e em seguida, incubadas com anticorpo de detecção por mais 2 horas. Depois das lavagens, foi incubado uma peroxidase conjugada com estreptavidina por 20 minutos, e após o substrato (peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina, 1:1), e a reação foi finalizada pela adição de ácido sulfúrico 2N. As placas foram lidas à 450nm em espectrofotômetro. A proteína total foi mensurada de acordo com Lowry et al. (1951), usando albumina de soro bovino como padrão.

3.6.2 Imunodeteção por western blot

O hipocampo dos ratos foi homogeneizado em tampão composto por duodecil sulfato de sódio 4%, Tris 50 mM, EDTA 100mM e β -mercaptoetanol 8%, pH 6,8. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 14-16% em duodecil sulfato de sódio em um sistema "mini-gel" (BioRad®). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham®), utilizando um sistema de transferência (BioRad). As proteínas de interesse foram identificadas através do uso de anticorpos primários da Merck Millipore, TLR2 (cod. 06-1119, USA), NLRP3 (cod. 06-1344, USA) e β -actina da Sigma Aldrich (cod. A2228, USA) incubados na

concentração de 1:1000. As membranas foram incubadas *overnight*. Após, foi realizado lavagens com tampão composto por tris básico, e o anticorpo secundário específico (conjugado à peroxidase) foi incubado por 1 hora, e após lavagens foi realizada a revelação das membranas por quimioluminescência utilizando um kit ECL da Amersham®, visualizadas e fotografadas utilizando um fotorevelador. As proteínas foram mensuradas de acordo com o método de Lowry et al. (1951) usando albumina de soro bovina como padrão. A quantificação foi realizada por densitometria das bandas, utilizando o software ImageJ.

3.7 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando o programa STATISTICA versão 8.0 (StatSoft, Inc., USA). O teste de normalidade Shapiro–Wilk foi realizado para confirmar se os dados possuíam uma distribuição normal. Os resultados do teste de labirinto octogonal foram analisados por análise de variância de duas vias de medidas repetidas (*repeated measures via two-way ANOVA*), seguido do teste de *post hoc* de Duncan quando o $p < 0,05$. Os dados do teste de memória de habituação foram analisados pelo teste t pareado, considerando o $p < 0,05$ estatisticamente significativo. Os dados de imunoensaio enzimático foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Duncan quando o $p < 0,05$. Os dados de western blot foram analisados por ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Duncan quando o $p < 0,05$. Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

4. RESULTADOS

Os resultados do labirinto octogonal foram analisados por análise de variância de duas vias de medidas repetidas (*repeated measures via two-way ANOVA*), utilizando como fatores o modelo e o tratamento. A figura 6A mostra a latência para encontrar a recompensa nos quatro braços, o qual foi observado interação entre o tratamento e a administração do βA_{1-42} [F (3,70) =2,36, $p<0,01$], e a figura 6B os erros totais que os animais cometeram até encontrar a recompensa o qual também houve interação entre a administração do βA_{1-42} e o tratamento [F (3,70) =3,30, $p<0,05$]. O teste *post hoc* de *Duncan* mostrou que o grupo controle tratado com água reduziu a latência para encontrar a recompensa a partir do 2º dia de teste quando comparado ao 1º dia ($p<0,005$), e também no 3º e 4º dia ($p<0,001$), assim como, reduziu os erros no 3º ($p<0,01$) e 4º dia ($p<0,001$). Os grupos controle tratados com lítio e memantina separadamente também aprenderam a tarefa, nos quais, houve redução significativa do tempo no 2º dia ($p<0,05$), e nos 3º e 4º dias ($p<0,001$), e nos erros no 3º ($p<0,01$) tratados com lítio e ($p<0,05$) tratados com memantina, no 4º dia ($p<0,05$) em ambos. O grupo controle tratado com lítio associado à memantina também reduziu o tempo para encontrar a recompensa quando comparado ao 1º dia de teste no 2º e 3º dias ($p<0,05$) e no 4º dia ($p<0,0001$). Nos erros apenas no 4º dia ($p<0,05$), porém isso se deve a melhor performance observada desde o primeiro dia quando comparado ao controle ($p<0,05$). Já nos animais submetidos a administração do βA_{1-42} , para induzir característica tipo DA, não houve redução do tempo no 2º dia de teste comparado ao 1º ($p=0,65$) nem no 3º ($p=0,197$), apenas reduziu no 4º dia ($p<0,005$), o mesmo foi observado nos erros (2º: $p=0,063$, 3º: 0,88, e 4º: $p<0,01$), em que os animais injetados com βA_{1-42} levaram mais tempo e cometeram mais erros em comparação aos controles (latência: 2º: $p<0,05$, 3º: $p<0,001$ e 4º dia: $p<0,0001$; Erros: 1º: $p<0,05$, 2º: $p<0,05$, 3º: $p<0,001$ e 4º dia: $p<0,05$). Os tratamentos com lítio e memantina isoladamente conseguiram reverter esse dano do βA_{1-42} na memória espacial, o lítio a partir do 2º dia, sendo todos os dias comparados ao 1º (latência e erros: $p<0,001$), e a memantina apenas a partir do 3º dia (latência: $p<0,0001$; Erros: $p<0,01$), e ambos os tratamentos foram mais rápidos que o 4º dia do modelo (tempo: $p<0,005$; Erros: $p<0,001$). Já a associação reduziu a latência para encontrar a recompensa apenas a partir do 3º dia ($p<0,05$) e 4º ($p<0,005$) para o tempo de latência e não houve diferença entre os dias quando observados os erros. Porém, os animais já apresentaram uma performance melhor desde o 1º dia quando comparado com o βA_{1-42} , sendo 1º dia (latência: $p<0,05$;

Erros: $p < 0,01$, 2º e 3º (latência e erros: $p < 0,01$) e 4º (tempo: $p < 0,05$). Assim, a associação parece ter sido melhor que os tratamentos isolados, já que desde o segundo dia os animais mostraram uma redução da latência e dos erros quando comparados ao modelo, e além disso, já no primeiro dia estes animais aprenderam mais rápido a tarefa, mostrando uma melhor performance cognitiva.

Figura 6

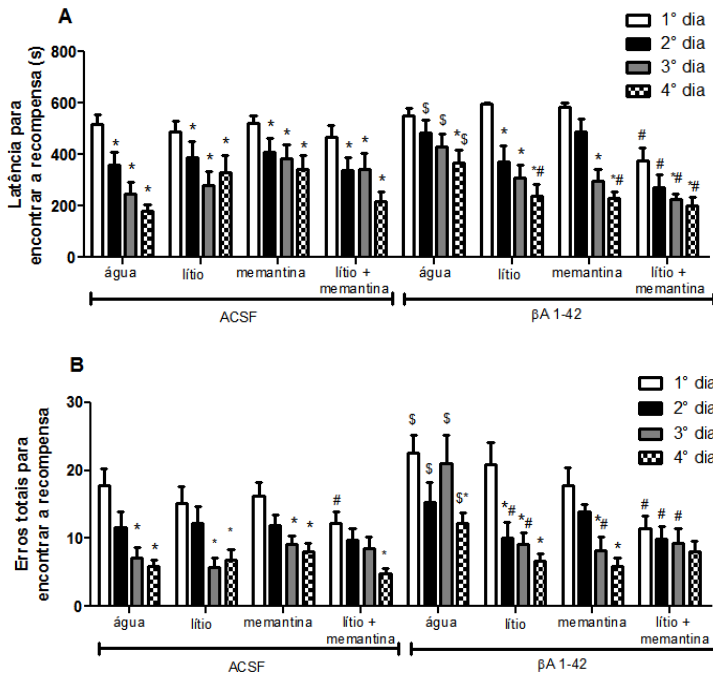


Figura 6: Efeito do lítio (5mg/kg), memantina (5mg/kg) ou associação de lítio e memantina no teste de labirinto octogonal realizado em ratos Wistar administrados com βA_{1-42} . A figura (A) mostra a latência para encontrar a recompensa em segundos e a figura (B) mostra os erros totais de entrada nos braços cometidos pelos animais até encontrar a recompensa. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 9-11 animais por grupo, * $p < 0,05$ quando comparado ao primeiro dia de teste do respectivo grupo, # $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo dia de teste do grupo βA_{1-42} + água, e \$ $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo dia de teste do grupo ACSF + água.

A figura 7A mostra a memória de referência a qual foi analisada por ANOVA de duas vias. Observou-se que houve interação entre a administração do βA_{1-42} e o tratamento [$F(3,70) = 4,44$, $p < 0,005$], sendo que o teste *post hoc* de Duncan apontou que o βA_{1-42} causou danos de memória espacial de referência nos animais quando comparado o último dia de teste com o controle ($p < 0,001$) e que o tratamento com lítio e memantina isoladamente conseguiu reverter o dano observado ($p < 0,005$) e ainda mais significativamente a associação ($p < 0,0001$). A figura 7B mostra os erros de memória de trabalho, o qual houve interação entre a administração do βA_{1-42} e o tratamento [$F(3,70) = 3,77$, $p < 0,05$], sendo que no 4º dia o modelo retornou mais vezes aos braços onde já tinha ingerido a comida quando comparado ao controle ($p < 0,05$) e o tratamento com memantina ($p < 0,05$) e ainda mais significativo a associação lítio e memantina ($p < 0,001$).

Figura 7

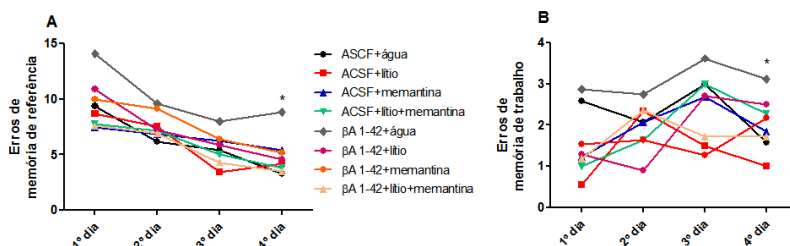


Figura 7: Efeito do lítio (5mg/kg), memantina (5mg/kg) ou associação de lítio e memantina no teste de labirinto octogonal realizado em ratos *Wistar* administrados com βA_{1-42} . A figura (A) mostra o número de entradas em braços que não continham recompensa, os quais foram considerados erros de memória de referência; e a figura (B) mostra o número de entradas em braços que a recompensa já tinha sido ingerida anteriormente, considerados erros de memória de trabalho. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 9-11 animais por grupo. (A) * $p < 0,05$ quando comparado o quarto dia de teste com todos os outros grupos. (B) * $p < 0,05$ quando comparado o quarto dia de teste com o grupo controle e o grupo βA_{1-42} tratado com memantina ou associação.

A figura 8A, mostra a memória de habituação (treino e teste), analisado por test t para amostras dependentes. Foi possível observar que os grupos todos os grupos controles apresentaram diferença no número de cruzamentos entre o treino e o teste. Ou seja, os grupos que receberam ACSF i.c.v. obtiveram ganho de memória de habituação (água [t (1,9) = 3,40; p= 0,007] / lítio [t (2,70) = p = 0,024] / memantina [t (1,10) = 5,98; p= 0,0005] / lítio + memantina [t (1,9) = 2,79; p= 0,02]. Quando induzido o modelo pela administração de βA_{1-42} , não houve diferença no número de cruzamentos [t (1,9) = 1,37 p= 0,22]. Quando os animais induzidos ao modelo foram tratados com lítio, memantina e associação, foi possível verificar diferença entre os números de cruzamentos no treino e teste, mostrando que o tratamento foi capaz de melhorar a memória de habituação nos animais. βA_{1-42} (agua [t (1,9) = 1,37; p = 0,22] / lítio [t (1,8) = 2,70 ; p= 0,02]) / memantina [t (1,8) = 5,98; p= 0,03] / lítio + memantina [t (1,8) = 2,79; p= 0,01). Já no número de levantamentos, figura 8B, todos os grupos experimentais aprenderam, ou seja, houve diferença nos números de levantamentos entre treino e teste. A memória exploratória de todos os grupos foi preservada. Tanto nos grupos que receberam ACSF (água [t (1,9) = 3,58; p= 0,05] / lítio [t (1,9) = 3,61; p= 0,005] / memantina [t (1,9) = 3,55; p= 0,005] / lítio + memantina [t (1,9) = 3,15; p= 0,01); Quanto nos grupos induzidos ao modelo (água [t (1,8) = 4,17; p= 0,08]) / lítio [t (1,8) = 4,65; p= 0,003]) / memantina [t (1,8) = 4,19; p= 0,003] / lítio + memantina [t (1,8) = 3,88; p= 0,008).

Figura 8

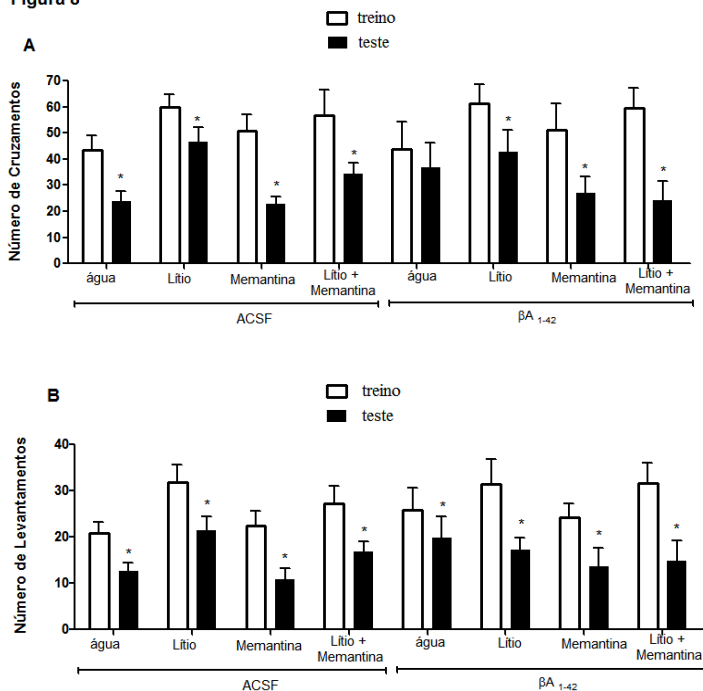


Figura 8: Efeito do lítio (5mg/kg), memantina (5mg/kg) ou associação de lítio e memantina na habituação ao campo aberto realizado em ratos Wistar administrados com βA_{1-42} . Figura (A) mostra o número de cruzamentos e (B) o número de levantamentos. As diferenças foram avaliadas entre treino e teste do mesmo animal 24 horas a primeira exposição ao aparato. Os dados são apresentados média \pm erro padrão de 9-11 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado a sessão treino de cada respectivo grupo.

Quando avaliada a IL-1 β no córtex frontal (figura 9A) foi possível observar pelo teste de ANOVA a interação entre a administração do β A e os tratamentos [$F(3,24)=2,88, p<0,05$]. Assim, nos animais que receberam βA_{1-42} houve um aumento desta citocina quando comparado aos animais controle ($p<0,01$) e este aumento foi revertido pelo tratamento com lítio ($p<0,05$) memantina ($p<0,001$) e a associação de ambos ($p<0,001$). Estes dois últimos tratamentos reduziram esta citocina a níveis menores que o do grupo controle ($p<0,05$). No hipocampo, o teste de ANOVA mostrou que a IL-1 β (figura 9B) também apresentou interação [$F(3,28)=2,86, p<0,05$], o qual, a administração do βA_{1-42} aumentou os níveis desta citocina quando comparado aos animais controle ($p<0,05$) e o tratamento com lítio, memantina e associação de ambos reverteram este aumento ($p<0,001$). Vale ressaltar que quando avaliado a IL-1 β em ambas estruturas, os tratamentos *per se*, causaram diminuição desta citocina quando comparados aos animais controle tratados com água. Talvez os tratamentos possam reduzir os níveis fisiológicos desta citocina, ou então, especula-se que a cirurgia estereotáxica, por ser uma cirurgia invasiva, possa ter ocasionado aumento de IL-1 β , uma vez que, foi observado este mesmo efeito quando avaliado o TNF- α no hipocampo (estrutura a qual é fixada a cânula guia). Os tratamentos desta forma, teriam conseguido reduzir também a inflamação ocasionada pela cirurgia. Contudo, é importante mencionar que os animais que apresentaram sinais ou foram constatados com encefalite no momento da eutanásia, foram imediatamente excluídos do estudo.

Figura 9

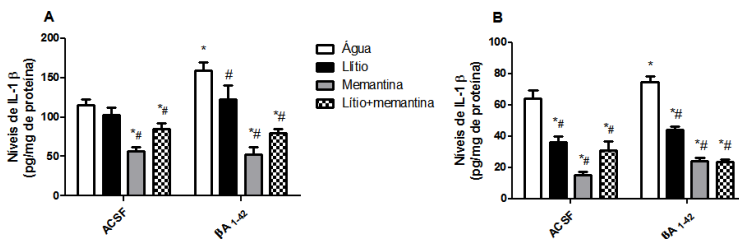


Figura 9: Efeito do lítio (5mg/kg), memantina (5mg/kg) ou associação de lítio e memantina nos níveis da citocina IL-1 β em córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos Wistar administrados com oligômeros βA_{1-42} . Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 4-6 animais por grupo, * $p<0,05$ quando comparado ao grupo ACSF + água, # $p<0,05$ quando comparado ao grupo βA_{1-42} + água.

A figura 10A mostra os níveis de $\text{TNF-}\alpha$ no córtex frontal, o qual não houve interação no ANOVA de duas vias [$F(3,28) = 0,38, p = 0,76$], não havendo diferença entre os grupos. No hipocampo (figura 10B) houve interação [$F(3,25) = 3,451, p < 0,05$], porém a administração do βA_{1-42} não aumentou os níveis de $\text{TNF-}\alpha$ quando comparado aos animais controle ($p = 0,45$). Porém o tratamento com lítio, memantina e associação de ambos, conseguiu reduzir os níveis desta citocina nos animais controle ($p < 0,001$) e nos animais administrados com βA_{1-42} ($p < 0,001$). Novamente não se pode afirmar se o efeito da medicação deu-se por redução dos níveis fisiológicos de $\text{TNF-}\alpha$ ou reverteram o dano ocasionado pela própria cirurgia.

Figura 10

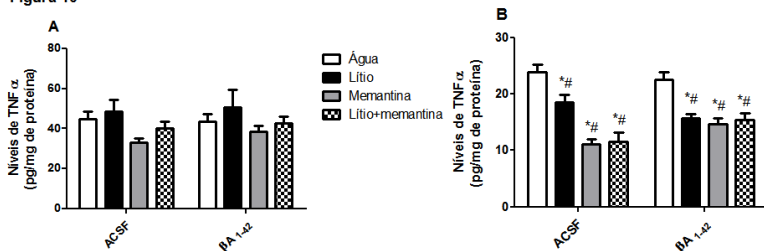


Figura 10: Efeito do lítio (5mg/kg), memantina (5mg/kg) ou associação de lítio e memantina nos níveis da citocina $\text{TNF}\alpha$ em córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos Wistar administrados com oligômeros βA_{1-42} . Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 4-6 animais por grupo, * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo ACSF + água, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo βA_{1-42} + água.

A figura 11A mostra os níveis de IL-4 no córtex frontal. Quando analisado por ANOVA foi observado interação entre a administração do βA_{1-42} e o tratamento [$F(3,25) = 9,07$, $p < 0,001$]. O teste post hoc de Duncan mostrou que a administração do βA_{1-42} reduziu os níveis da IL-4 quando comparado ao grupo controle ($p < 0,01$). O tratamento com lítio ($p < 0,05$), memantina ($p < 0,0001$) e associação destes ($p < 0,0001$) conseguiu elevar novamente os níveis da IL-4, sendo que esses dois últimos apresentaram níveis de IL-4 maiores inclusive que o controle ($p < 0,05$). No hipocampo (figura 11B), também foi observado interação entre a administração com βA_{1-42} e o tratamento [$F(3,25) = 8,94$, $p < 0,001$], e a administração do βA_{1-42} também reduziu IL-4 ($p < 0,05$), porém, apenas o tratamento com memantina ($p < 0,001$) e associação de lítio e memantina ($p < 0,001$) reverteram essa diminuição, igualando novamente aos níveis do grupo controle.

Figura 11

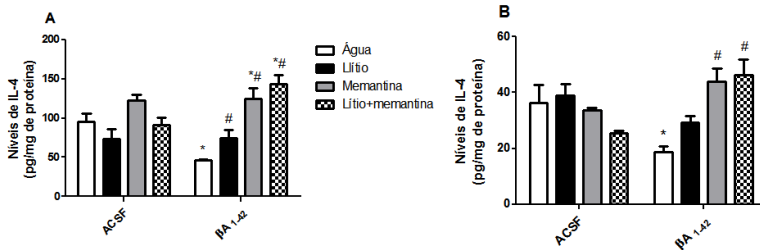


Figura 11: Efeito do lítio (5mg/kg), memantina (5mg/kg) ou associação de lítio e memantina nos níveis da citocina IL-4 em córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos Wistar administrados com oligômeros βA_{1-42} . Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 4-6 animais por grupo, * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo ACSF + água, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo βA_{1-42} + água.

A figura 12 mostra os resultados de western blot no hipocampo. No hipocampo dos animais administrados com βA (figura 12A) houve diferenças significativas entre os grupos experimentais ($F=2,93$; $p=0,02$), sendo que houve aumento do conteúdo de TLR2 nos animais submetidos a administração de βA ($p=0,02$) quando comparado aos animais controle (ACSF). O lítio e a associação de lítio e memantina foram capazes de reduzir o conteúdo desse receptor quando comparados aos animais submetidos ao modelo ($p<0,05$), retornando novamente a níveis de controle, porém o mesmo não foi observado no tratamento com memantina isolado. Quando avaliado os níveis de NLRP3 (figura 12B), foi possível observar também diferenças significativas entre os grupos ($F=2,78$; $p=0,03$), sendo que houve aumento de NLRP3 nos animais administrados com βA quando comparado ao controle ($p=0,02$) e o tratamento com lítio isoladamente causou uma redução, mas não foi estatisticamente significativa em relação aos animais submetidos ao modelo, o tratamento com memantina não causou nenhuma redução, e já o tratamento associado de lítio e memantina causou redução dos níveis de NLRP3 comparado aos animais administrados com βA ($p=0,03$).

Figura 12

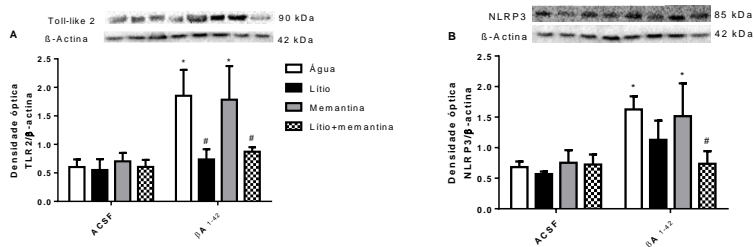


Figura 12: Efeito do lítio (5mg/kg), memantina (5mg/kg) ou associação de lítio e memantina no conteúdo proteico de proteínas de sinalização de inflamação no hipocampo dos animais. A figura (A) mostra o conteúdo de TLR2 e (B) mostra o conteúdo de NLRP3 de ratos Wistar administrados com oligômeros βA_{1-42} . Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 4 animais por grupo, * $p<0,05$ quando comparado ao grupo ACSF + água, # $p<0,05$ quando comparado ao grupo βA_{1-42} + água.

5. DISCUSSÃO

Os sintomas iniciais da DA são as alterações na memória espacial e cognitiva (Reas et al., 2017). Mudanças estruturais como atrofia no hipocampo, córtex entorrinal e lobo temporal medial, são fortes associações encontradas com a prática clínica (Clerx et al., 2012; McDonald et al., 2012). A memória é uma dimensão da função cognitiva integrada dos seres humanos, e há vários tipos de memória, incluindo episódica, processual, emocional e semântica. A memória episódica refere-se à capacidade de recordar os eventos passados ou a experiência pessoal, e também é uma das características principais observadas na DA (Lo, 2017). Alterações intracelulares tais como acumulação de peptídeo β -amilóide, hiperfosforilação da Tau, perda sináptica, morte neuronal e celular, são também características da DA (Alonso et al., 2011; Engels et al., 2016).

Para avaliar de memória espacial em roedores, no presente estudo, foi utilizado o labirinto octogonal, onde o animal precisa consolidar, armazenar e recordar em qual braço estava a recompensa, além de não retornar onde já consumiu a mesma (memória de trabalho) (Foyet et al., 2011; Hritcu et al., 2012). A principal característica do labirinto octogonal, é que o teste necessita de orientação espacial para o animal completar a tarefa (Dellu et al., 1997). Já nos estágios iniciais da DA, os pacientes apresentam desorientação e comprometimento da memória visuoespacial, sendo um dos danos de memória mais evidentes, uma vez que o paciente ao sair na rua sozinho, muitas vezes não consegue voltar para casa, e esse acaba sendo um sinal de alarme para o indivíduo e para os familiares buscarem o diagnóstico da doença (deIpolyi et al., 2007; Tu et al., 2015; Foxe et al., 2016). Em vista disso, com os nossos resultados, podemos observar que após a administração do peptídeo β -amilóide $1-42$, houve um déficit na memória espacial, visto no teste do labirinto octogonal, onde os animais levaram mais tempo e cometeram mais erros para encontrar a comida nos 4 braços. Quando os animais foram tratados com Lítio, Memantina e associação de ambos, houve uma melhora cognitiva. Nossos resultados estão de acordo com a literatura, em que a administração do peptídeo β -amilóide $25-32$, causou dano na memória espacial observado no labirinto octogonal e no teste de Morris. Nesse mesmo estudo o déficit cognitivo foi associado aos baixos níveis de BDNF e aumento de malondealdeído nos animais que receberam peptídeo (Nanaware et al., 2017). Já na memória de trabalho, nossos resultados indicam, que os animais que foram administrados βA_{1-42} , tiveram um menor desempenho na memória de trabalho e na memória de referência.

Outros estudos mostram que em modelo animal da DA em ratos induzido por escopolamina, foi possível observar dano cognitivo nas memórias citadas acima, em ratos wistar (Hritcu et al., 2015). Esse teste comportamental do labirinto octagonal, é dependente do processamento de memórias de curta e de longo prazo que acontece no hipocampo, região cerebral mais afetada na DA (Park et al., 2012).

O carbonato de lítio vem ganhando destaque nas pesquisas, por causar diminuição da inflamação e melhora cognitiva (Zhou et al., 2017). O tratamento com 300 µg/dia com carbonato de lítio de pacientes com DA durante 15 meses, mostrou melhora no desempenho no teste do mini-exame do estado mental em comparação ao grupo que recebeu tratamento placebo, mostrando ser eficaz contra o declínio cognitivo em pacientes com diagnóstico clínico de DA (Nunes et al., 2013). Camundongos transgênicos da APP (modelo genético da DA), com 6 meses de idade, receberam o tratamento com lítio (0,25 mg/kg), tiveram uma redução significativa na latência para encontrar a caixa de fuga no teste do labirinto de Barnes (Nunes et al., 2015). Além disso, Mury et al. (2015) mostrou que o lítio (70ng/g) apresenta um importante efeito na retenção da memória de longo prazo, e este efeito pode ser mediado pelo aumento da transcrição de membros da família da enzima fosfolipase A2 em ratos Wistar machos, tratados por 100 dias.

O tratamento com baixa dose de lítio (40µg/kg) durante 2 meses, foi capaz de melhorar o reconhecimento de um objeto novo, memória espacial, em animal transgênico (cGill-R-Thy1-APP) para DA (Mury et al., 2016). Já, o tratamento com memantina (5mg/kg) em animais APP/PS1, os autores observaram um melhor desempenho cognitivo no teste do Labirinto de Morris. Após o tratamento, os animais diminuíram o tempo de latência de fuga, natação, e diminuindo o tempo de latência no quadrante sem a plataforma (Liu et al., 2014). Em pacientes com comprometimento cognitivo leve, que foram tratados por 48 semanas com memantina (5mg/kg), tiveram uma melhora na memória semântica (Algin et al., 2017). Em culturas de células, a memantina (4 µM) foi possível reduzir a apoptose, por diminuir a caspase-3 e níveis de Ca^{++} celular (Wang et al., 2017c). Em camundongos Tg2576, o tratamento com memantina na dose de 10mg/kg durante 4 semanas, foi possível reduzir os níveis insolúveis de βA, além de diminuir a atividade das enzimas α-secretase, β-secretase e γ-secretase (Ito et al., 2017). Resultados de Deardorff e colaboradores (2016) mostrou que a combinação de Memantina (10mg) e Donepezil (10mg) em pacientes com DA, melhorou a pontuação na escala cognitiva desses pacientes (Deardorff e Grossberg, 2016). Outros resultados mostram que a combinação de Memantina e

donepezil, ambos 10mg, melhorou a pontuação dos pacientes com DA no Mini exame do estado mental (Howard et al., 2015).

Nesse trabalho também se avaliou a memória de habituação. Os resultados corroboram com a literatura, em que os animais APP/PS1 houve alterações na memória de habituação no campo aberto (Liu et al., 2017b; Nie et al., 2017). Outros resultados em modelo animal da DA, induzido pelo peptídeo βA_{25-35} , os animais tiveram dano de memória avaliado pelo teste de Morris e na habituação ao campo aberto. Nesse estudo, os animais foram tratados com Lítio por 30 dias (concentração de 0,24% de Li_2CO_3), visto que após o tratamento os animais tiveram benefícios na memória de habituação e espacial (Gelfo et al., 2017).

Até o momento, poucos são os estudos mostram a associação de lítio e memantina. Um estudo de caso controle em pacientes com transtorno bipolar, verificou que a associação de lítio (300 mg) e memantina (20mg), resultou num efeito antimaniaco (Serra et al., 2014). Nossos dados mostram que os animais que receberam tratamentos combinando lítio e memantina, indicou melhores níveis de desempenho cognitivo na tarefa de labirinto radial do que os ratos dos grupos que receberam tratamento com memantina ou lítio sozinhos. Na habituação ao campo aberto, tanto a combinação quanto sozinho, lítio e memantina melhoraram a memória.

Portanto, a associação de lítio e memantina parece ser uma terapia alternativa que deve ser investigada para uso no tratamento de deficiências cognitivas observadas em DA. Esta abordagem é muito válida neste trabalho, porque, embora a memantina seja aprovada pelo FDA para o tratamento de DA, não é totalmente efetiva (Smith, 2009). Sendo assim, sugere-se um maior interesse em investigar e aplicar associações de medicamentos envolvendo memantina para aumentar a resposta terapêutica em pacientes com DA. Entre estas combinações está a associação de inibidores de memantina e acetilcolinesterase (Riverol et al., 2011; Gauthier e Molinuevo, 2013). O presente estudo foi o primeiro a analisar a combinação de memantina e lítio, e nossos resultados evidenciam uma terapia combinada promissora para o tratamento das alterações cognitivas encontradas na DA. Mais estudos precisam ser realizados para tornar essas descobertas mais robustas.

A neuroinflamação tem emergido como um dos mecanismos centrais para o desenvolvimento e progressão da DA (Heppner et al., 2015). A neuroinflamação parece estar presente nos estágios iniciais e avançados da DA, uma vez que foi observado ativação de astrócitos no córtex parietal de pacientes com dano cognitivo leve (Carter et al., 2012), e em todos estágios da doença, ativação de micróglias residentes e infiltração de monócitos e macrófagos no cérebro de pacientes (Czirr e Wyss-Coray,

2012; Venneti et al., 2013). Os estudos avaliando o envolvimento da DA com o sistema imune inato tem aumentado principalmente após a descoberta de polimorfismos em vários genes relacionadas com a resposta inflamatória e fagocitose em pacientes com DA (Lambert et al., 2013; Ramanan et al., 2015). A neuroinflamação está relacionada ao prejuízo cognitivo observado na doença, sendo que, estudos observaram a associação entre o declínio cognitivo e os níveis de mediadores inflamatórios no sangue e LCR de pacientes com DA (Solfrizzi et al., 2006; Harries et al., 2012; Westin et al., 2012), além do aumento de citocinas pró-inflamatórias no soro, cérebro e no LCR desses pacientes (Jack et al., 2013; Zhang et al., 2013; Dursun et al., 2015).

Os astrócitos e as microglias possuem PRRs que quando ativados atuam desencadeando uma resposta imune inata, caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios, tais como, IL-1 β , TNF- α , IL-4 e IL-10 (Heneka et al., 2015a). Essa resposta imune pode ser desencadeada por várias moléculas associadas à danos, na DA acredita-se que a resposta imune ocorra principalmente através da ativação dos receptores por fragmentos β A, levando a produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios que podem contribuir para disfunção, lesão e morte neuronal (Ferretti et al., 2012). Apesar desses fragmentos β A à princípio não serem associados a patógenos, essas fibras amiloides são muito similares as fibras curli, que são encontradas na matriz extracelular de enterobactérias, sendo esta, uma das teorias que justifica essa ativação tão intensa de receptores da imunidade inata por fragmentos β A (Rapsinski et al., 2015).

Dependendo das moléculas de sinalização, as células da micróglia e astrócitos podem induzir a produção de moléculas pró e/ou anti-inflamatórias (Heneka et al., 2014). Corroborando com os estudos mencionados anteriormente, no presente estudo foi possível observar que a administração i.h. de oligômeros β A em ratos induziu o aumento da produção de IL-1 β e redução de IL-4 em córtex frontal e hipocampo desses animais. A sinalização de IL-1 β induz o aumento da ativação intracelular do fator de transcrição NF- κ B, ativando a produção de outras citocinas inflamatórias e propagando a resposta imune (Webster et al., 2017). Uma das causas dos danos de memória observados nos animais administrados com β A no presente estudo pode estar relacionada ao aumento de IL-1 β no córtex e hipocampo dos animais, já que o aumento dessa citocina é capaz de inibir a LTP no hipocampo de roedores (Tarr et al., 2011; Liu et al., 2012b) e reduzir a neurogênese (O'Leime et al., 2017). Além disso, a superexpressão dessa citocina causa danos na memória contextual e espacial de longa duração dependente do hipocampo em

camundongos transgênicos (Hein et al., 2010), enquanto que o bloqueio de IL-1 β melhora a memória espacial de camundongos transgênicos para DA (Kitazawa et al., 2011).

O TNF- α é uma citocina com papel central na iniciação e manutenção da resposta inflamatória, sua sinalização está relacionada com piora da memória espacial de ratos, além de aumento da sinalização de NF- κ B, responsável pela produção de citocinas e exacerbação da resposta inflamatória (Belarbi et al., 2012; Ma et al., 2015). O tratamento com lítio, memantina e associação destes, além de melhorar a memória dos animais, reduziu os níveis de IL-1 β no hipocampo e no córtex frontal dos animais administrados ou não com β A₁₋₄₂, e o mesmo foi observado nos níveis de TNF- α , porém apenas no hipocampo.

O efeito anti-inflamatório do lítio já foi demonstrado em outros estudos, sendo que tratamento crônico com lítio reduziu a produção de ácido araquidônico em um modelo de neuroinflamação induzido por LPS no cérebro de ratos (Basselin et al., 2007), em outro estudo, em cultura de células gliais de ratos incubadas com LPS, o lítio na dose de 10mM (considerada alta) reduziu os níveis de TNF- α , IL1- β , prostaglandina E2 e NO, além de reduzir significativamente a expressão de COX-2 e iNOS (Nahman et al., 2012). Em modelo de traumatismo encefálico em camundongos o lítio (1 mmol/kg) durante duas semanas reduziu os níveis de IL-1 β no córtex dos animais (Yu et al., 2012). O tratamento com lítio (1 mmol/kg) durante 6 dias também reduziu a ativação microglial e os níveis de IL-1 β em cérebro total de camundongos em modelo hipóxia isquêmica (Li et al., 2011), e em outro estudo, utilizando modelo de hemorragia cerebral em ratos, o tratamento com lítio (60 mg/kg) durante 21 dias reduziu o conteúdo de NF- κ B e COX-2 (Zheng et al., 2016).

Em modelo animal de DA o tratamento crônico com lítio (333 mg/kg) em camundongos transgênicos reduziu a ativação microglial em córtex frontal e hipocampo dos animais, além de reduzir os níveis de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e outros mediadores inflamatórios no cérebro (Sudduth et al., 2012), em outro estudo com camundongos transgênicos para DA o lítio (3 mEq/kg i.p.) por 12 semanas reduziu a microgliose e a astrogliose no córtex total e hipocampo (Toledo e Inestrosa, 2010). Porém, o presente estudo é o primeiro a mostrar que o lítio mesmo em baixas doses pode reduzir os níveis de citocinas inflamatórias induzidas pela administração de oligômeros β A₁₋₄₂ no cérebro de ratos.

A memantina também já demonstrou possuir efeito anti-inflamatório em estudos pré-clínicos. Em ratos o tratamento com uma dose baixa de memantina (0,2 e 1,0 mg/kg) reduziu significativamente o aumento de IL-

1 β no soro e no córtex frontal dos animais, o qual foi induzido por repetidas injeções de morfina (Chen et al., 2012). A memantina também reduziu moléculas de adesão e a permeabilidade da BHE, além de reduzir o conteúdo de NF κ B em cultura de endotélio vascular cerebral humano (Wang et al., 2017b). O tratamento com memantina (20 mg/kg i.p.) durante 14 dias, reduziu os níveis de IL-1 β e TNF- α no estriado de ratos submetidos a um modelo de Doença de Parkinson (Kaur e Prakash, 2017). Em modelo de encefalomielite autoimune o tratamento com memantina (60 mg/kg i.p.) reduziu o conteúdo de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no córtex de ratos (Sulkowski et al., 2013), e, a memantina (20 mg/kg v.o.) durante 14 e 21 dias também reduziu os níveis de IL-1 β e TNF- α no hipocampo de ratos após a administração i.c.v. de colchicina (Sil et al., 2016). Ainda, a memantina na dose de 10 mg/kg v.o. durante 13 dias causou redução nos níveis de IL-1 β e TNF- α no hipocampo e córtex total de ratos, citocinas essas aumentadas pela administração i.c.v. de estreptozotocina, além disso a memantina reestabeleceu os níveis das subunidades dos receptores NMDA, dessa forma, os autores relacionam o efeito anti-inflamatório da memantina com a modulação desses receptores (Rai et al., 2013), essa mesmo mecanismo de modulação da inflamação através de receptores NMDA foi defendida por Weng et al. (2015).

De qualquer forma, o presente estudo é o primeiro a relatar a redução de citocinas inflamatórias ocasionada pelo tratamento com memantina em modelo animal de DA induzido pela administração de β A₁₋₄₂. É possível que ocorra um sinergismo na ação anti-inflamatória de lítio em associação com a memantina, porém isso não foi observado no presente estudo, talvez devido ao efeito anti-inflamatório dos fármacos isoladamente já ter sido tão eficaz em reduzir essas citocinas pró-inflamatórias.

A IL-4 é considerada uma citocina anti-inflamatória, a ativação do receptor de IL-4 (IL-4R) pela IL-4 leva à ativação do receptor ativados por proliferadores de peroxissoma γ (PPAR γ), a ativação de PPAR γ e suas vias agem modulando a função microglial e os macrófagos residentes do SNC, controlando a liberação de citocinas e limitando a inflamação (Zhao et al., 2015b). No presente estudo a administração de β A₁₋₄₂ causou redução de IL-4, e o tratamento com lítio, memantina e associação de ambos reverteu essa redução no córtex frontal dos ratos, e apenas memantina e a associação, reverteu a redução de IL-4 no hipocampo. Foi observado que o tratamento com IL-4 ocasionou redução de IL-1 β e TNF- α no hipocampo de ratos administrados com β A₁₋₄₂ e também reduziu a ativação glial *in vitro*, além disso, a IL-4 evitou a inibição da LTP causada por β A₁₋₄₂ nesses animais (Lyons et al., 2007). Dessa forma, possivelmente, a redução de IL-4 observada nos animais submetidos ao

modelo no presente estudo pode ter contribuído para o dano de memória observado nesses animais, já que o efeito dessa citocina é amplamente relacionado a melhora da função cognitiva (Gadani et al., 2012). Além de estar possivelmente relacionado ao aumento de IL-1 β e TNF- α observado nas estruturas cerebrais dos animais administrados com β A₁₋₄₂, já que o tratamento com lítio, memantina e associação destes ocasionou concomitantemente o aumento de IL-4 e redução de IL-1 β e TNF- α .

O efeito do lítio em aumentar os níveis de citocinas anti-inflamatórias e reduzir pró-inflamatórias modulando a resposta imune já havia sido descrito Rapaport e Manji (2001), acredita-se que esse efeito esteja relacionado a inibição da GSK-3 β , um estudo mostrou que a inibição de GSK-3 β utilizando SB216763 ocasionou um aumento da ligação de CREB ao DNA levando a um aumento na expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 (Martin et al., 2005). Outro estudo verificou que em pacientes bipolares eutímicos o tratamento com lítio por no mínimo 8 semanas causou aumento dos níveis de IL-4 no soro (Guloksuz et al., 2010), o tratamento com lítio (1 mg/kg de peso corporal) durante 6 semanas também reduziu os níveis de IL-4 no soro de ratos, níveis esses aumentados pela administração de cádmio (Al-Azemi et al., 2010). A nível de SNC foi relatado que o tratamento com lítio (47,5 mg/kg i.p) durante 7 dias reduziu os níveis de IL-4 no estriado e córtex frontal aumentados pela administração de anfetamina em um modelo de mania em ratos (Valvassori et al., 2015), diferente do presente estudo, em que o lítio ocasionou um aumento dos níveis dessa citocina, porém isso mostra a ação modulatória do lítio em retornar os níveis de IL-4 a níveis basais, mantendo a homeostase do SNC.

No plasma de camundongos transgênicos para DA também foi observado redução de IL-4, porém o tratamento com memantina (10 mg/kg) por 150 dias não foi capaz de aumentar esses níveis (Wang et al., 2016a). Esse é o único estudo encontrado na literatura que avaliou o efeito da memantina nos níveis de IL-4, porém a ação da memantina na inflamação já foi relatada, sendo que esta é capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS (Suhs et al., 2016) e prevenir a ativação microglial (Wu et al., 2009). Como mencionado anteriormente o antagonismo de receptores NMDA já foi estreitamente relacionado a mecanismos inflamatórios e ativação microglial, mecanismos esses que incluem a ativação do inflamassoma NLRP3 (Weng et al., 2015).

Os mecanismos pelos quais o β A pode induzir a neuroinflamação na DA ainda não estão elucidados. Uma das vias que está em maior evidência nos últimos estudos envolvendo neuroinflamação na DA é a via

de sinalização que envolve a ativação de receptores TLR2 e a montagem do inflamassoma NLRP3, sendo essa via, alvo de estudos atuais de grande relevância (Heneka et al., 2013; He et al., 2016; Liston e Masters, 2017; Wang et al., 2017a). Para tentar elucidar quais proteínas estão envolvidas no mecanismo neuroprotetor do lítio, memantina e associação de lítio e memantina contra oligômeros βA_{1-42} , o presente estudo investigou o conteúdo de TLR2 e NLRP3 no hipocampo dos animais, já que essa é a estrutura mais relacionada com a formação da memória e é a região mais afetada na DA (Hirjak et al., 2017) e foi a estrutura que mais apresentou alterações nos níveis de citocinas no presente estudo.

Estudos mostraram que as fibras amiloides são fortemente reconhecidas pelos receptores TLR2 (Jana et al., 2008; Liu et al., 2012; Rapsinski et al., 2015). O TLR2 tem um papel central na toxicidade do βA_{1-42} , já que em camundongos nocaute para TLR2 não ocorre ativação microglial após a administração de βA_{1-42} (Jana et al., 2008), e o mesmo foi observado em camundongos transgênicos para DA (Liu et al., 2012). Já foi observado também, aumento da transcrição e expressão de TLR2 no córtex de camundongos transgênicos para DA e no mesmo estudo, porém em humanos, foram encontradas muitas células positivas para TLR2 em torno das placas amiloides no córtex de pacientes com DA (Letiembre et al., 2009). Além disso, vários polimorfismos nos genes de TLR2 já foram associados ao aumento do risco para o desenvolvimento da DA (Wang et al., 2011b; Sohrabifar et al., 2015; Rezazadeh et al., 2016). No presente estudo foi possível confirmar o envolvimento dos receptores TLR2 na toxicidade ocasionada pelos oligômeros βA_{1-42} , sendo que foi encontrado aumento do conteúdo de TLR2 após a administração de βA_{1-42} no hipocampo desses animais.

No presente estudo o tratamento subcrônico com uma baixa dose de lítio e sua associação com memantina foi capaz de reduzir o conteúdo de TLR2 nos animais administrados com βA_{1-42} . Provavelmente a redução do conteúdo de TLR2 está relacionado com a redução de citocinas inflamatórias observadas no hipocampo desses animais após o tratamento, uma vez que os receptores TLRs são a principal classe de receptores da imunidade inata responsáveis pela produção de citocinas (Acheh et al., 2016). Porém, esse efeito parece estar relacionado apenas ao mecanismo do lítio, uma vez que a memantina isoladamente não foi capaz de reduzir o conteúdo de TLR2, apenas quando associada.

Um dos principais mecanismos do lítio é a inibição da enzima GSK3 β (Sofola-Adesakin et al., 2014). Foi demonstrado que um inibidor de GSK3 β , o SB216763, causou regulação da resposta imune em cultura de

monócitos humanos, reduzindo citocinas inflamatórias, via sinalização de TLR2, NF- κ B e CREB, no mesmo estudo, porém em camundongos, o mesmo inibidor da GSK3 β causou redução da letalidade induzida por LPS em camundongos, além de redução de citocinas inflamatórias (Martin et al., 2005). Outro estudo mais recente, mostrou que o lítio (100 mg/kg) regulou negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias produzidas via ativação de receptores TLR2 induzida pelo cocobacilo gram-negativo *Francisella tularensis*, além de melhorar a sobrevivência desses camundongos (Zhang et al., 2009). Em cultura de queratinócitos epidérmicos humanos expostos ao lítio também foi observado redução do conteúdo de TLR2 (Ballanger et al., 2008). Porém, o presente é o primeiro estudo que mostra o efeito do lítio em reduzir o conteúdo de TLR2 no hipocampo de camundongos, tendo esse resultado uma importante implicação para elucidar os mecanismos protetores do lítio na DA.

O inflamassoma NLRP3 desempenha um papel central na neuroinflamação observada na DA (Heneka et al., 2013; Saresella et al., 2016; Zhou et al., 2016). A sobrecarga de β A na micróglia pode ativar receptores TLRs, principalmente TLR2, induzindo a montagem do inflamassoma NLRP3, o qual é responsável pela clivagem, maturação e liberação de IL-1 β para o meio extracelular (Kim et al., 2017), levando à amplificação da resposta imune. Foi possível observar no presente estudo o aumento da proteína NLRP3 no hipocampo dos animais administrados com β A₁₋₄₂, esse aumento provavelmente ocasionou o aumento de IL-1 β observado no hipocampo desses animais. Além disso, o tratamento com lítio ocasionou redução dos níveis de NLRP3, porém essa redução não foi estatisticamente significativa quando comparada aos animais submetidos a administração de β A, o tratamento com memantina isoladamente também não foi capaz de reduzir o conteúdo da proteína que compõe o inflamassoma, porém quando associados, o tratamento com lítio e memantina ocasionou redução de NLRP3.

Na literatura ainda não há nenhum estudo avaliando o envolvimento do inflamassoma NLRP3 no mecanismo de ação do lítio. Os únicos estudos que encontraram essa relação foram Liu et al. (2015), no qual o estresse crônico causou aumento de NLRP3 e aumento do conteúdo de GSK3 β e o exercício físico causou redução do conteúdo de ambas proteínas no córtex frontal de ratos e no estudo de Zhao et al. (2015a), em que a inibição da inibição da GSK-3 β por um RNA de interferência, causou redução de NLRP3 e de IL-1 β em macrófagos derivados da medula óssea de ratos. Assim, no presente estudo possivelmente a inibição da GSK3 β

foi um dos mecanismos responsáveis pela redução de NLRP3, porém essa não pode ser a única explicação, uma vez que essa redução não foi significativa. Porém quando associado a memantina houve um sinergismo, o qual levou a uma redução significativa.

Sobre a memantina, também não há nenhum estudo em relação ao NLRP3. O que se sabe é que em cultura de células microgliciais incubadas com hemin (produto citotóxico da degradação da hemoglobina que causa dano secundário na hemorragia cerebral), houve ligação entre o receptor NMDA e o NLRP3, e o uso de MK-801 (antagonista NMDA, assim como a memantina) causou redução do conteúdo de NLRP3 e IL-1 β , dessa forma, os autores relacionaram a ativação de NLRP3 diretamente com a ativação de receptores NMDA (Weng et al., 2015), além disso, foi observado o aumento do conteúdo e expressão de NLRP3 em cultura de células β -pancreáticas de camundongos incubadas com altos níveis de glicose, e a incubação com MK-801 impediu esse aumento, além de reduzir IL-1 β (Huang et al., 2017). Dessa forma, a inibição da GSK3, causada pelo lítio, juntamente com o antagonismo de receptores NMDA causada pela memantina, podem ter atuado conjuntamente a redução de NLRP3 no hipocampo dos animais tratados, e consequentemente a redução da liberação de IL-1 β e outras citocinas. Mais estudos são necessários para afirmar quais os mecanismos estão envolvidos na redução da sinalização imune quando associados os dois fármacos. De qualquer forma, é a primeira vez que é demonstrado efeito protetor e redução da sinalização inflamatória que envolve TLR2 e o inflamassoma NLRP3 após a associação de lítio e memantina.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo foi o primeiro a utilizar a associação de lítio e memantina em modelo animal de demência do tipo DA. Os resultados mostraram que o tratamento subcrônico com lítio, memantina e a associação com lítio e memantina reverteram o dano na memória espacial e na memória de habituação ao campo aberto dos animais administrados com oligômeros βA_{1-42} . Contudo, o tratamento combinado de lítio e memantina teve uma melhor performance no teste de memória espacial em relação aos outros grupos experimentais, indicando um efeito terapêutico promissor da associação destes fármacos. O tratamento com ambos os fármacos isoladamente reestabeleceu os níveis das citocinas inflamatórias avaliadas, mas a associação dos fármacos não potencializou esse efeito. Porém, apenas a associação de lítio e memantina se mostrou eficaz em reduzir o conteúdo de NLRP3, sendo um possível efeito promissor da associação destes fármacos para DA e outras doenças neurodegenerativas.

REFERÊNCIAS

- Achek A, Yesudhas D, Choi S. Toll-like receptors: promising therapeutic targets for inflammatory diseases. 2016.
- Al-Azemi M, Omu FE, Kehinde EO, Anim JT, Oriowo MA, Omu AE. Lithium protects against toxic effects of cadmium in the rat testes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2010;27(8):469-76.
- Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacology & therapeutics*. 2013;138(2):155-75.
- Alley GM, Bailey JA, Chen D, Ray B, Puli LK, Tanila H, Banerjee PK, Lahiri DK. Memantine lowers amyloid- β peptide levels in neuronal cultures and in APP/PS1 transgenic mice. *Journal of neuroscience research*. 2010;88(1):143-54.
- Alonso JF, Poza J, Mananas MA, Romero S, Fernandez A, Hornero R. MEG connectivity analysis in patients with Alzheimer's disease using cross mutual information and spectral coherence. *Annals of biomedical engineering*. 2011;39(1):524-36.
- Anand R, Gill KD, Mahdi AA. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*. 2014;76, Part A(0):27-50.
- Apostolova LG. Alzheimer Disease. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2016;22(2 Dementia):419-34.
- Arif M, Chikuma T, Ahmed MM, Nakazato M, Smith MA, Kato T. Effects of memantine on soluble Alphas(25-35)-induced changes in peptidergic and glial cells in Alzheimer's disease model rat brain regions. *Neuroscience*. 2009;164(3):1199-209.
- Ayyalasomayajula N, Suresh C. Mechanistic comparison of current pharmacological treatments and novel phytochemicals to target amyloid peptides in Alzheimer's and neurodegenerative diseases. 2017:1-13.
- Bagyinszky E, Giau VV, Shim K, Suk K, An SSA, Kim S. Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis. *Journal of the neurological sciences*. 2017;376:242-54.
- Bakchine S, Loft H. Memantine treatment in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: results of a randomised, double-blind, placebo-controlled 6-month study. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2008;13(1):97-107.
- Ballanger F, Tenaud I, Volteau C, Khammari A, Dreno B. Anti-inflammatory effects of lithium gluconate on keratinocytes: a possible explanation for efficiency in seborrhoeic dermatitis. *Archives of dermatological research*. 2008;300(5):215-23.

- Barage SH, Sonawane KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. 2015;52:1-18.
- Basselin M, Villacreses NE, Lee HJ, Bell JM, Rapoport SI. Chronic lithium administration attenuates up-regulated brain arachidonic acid metabolism in a rat model of neuroinflammation. *Journal of neurochemistry*. 2007;102(3):761-72.
- Belarbi K, Jopson T, Tweedie D, Arellano C, Luo W, Greig NH, Rosi S. TNF- α protein synthesis inhibitor restores neuronal function and reverses cognitive deficits induced by chronic neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation*. 2012;9:23-.
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium--a life and death signal. *Nature*. 1998;395(6703):645-8.
- Bezprozvanny I, Mattson MP. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends in neurosciences*. 2008;31(9):454-63.
- Booth CA, Ridler T, Murray TK, Ward MA, de Groot E, Goodfellow M, Phillips KG, Randall AD, Brown JT. Electrical and Network Neuronal Properties Are Preferentially Disrupted in Dorsal, But Not Ventral, Medial Entorhinal Cortex in a Mouse Model of Tauopathy. *The Journal of Neuroscience*. 2016;36(2):312-24.
- Brorson JR, Bindokas VP, Iwama T, Marcuccilli CJ, Chisholm JC, Miller RJ. The Ca²⁺ influx induced by beta-amyloid peptide 25-35 in cultured hippocampal neurons results from network excitation. *Journal of neurobiology*. 1995;26(3):325-38.
- Canobbio I, Abubaker AA, Visconte C, Torti M, Pula G. Role of amyloid peptides in vascular dysfunction and platelet dysregulation in Alzheimer's disease. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015;9:65.
- Carter SF, Scholl M, Almkvist O, Wall A, Engler H, Langstrom B, Nordberg A. Evidence for astrogliosis in prodromal Alzheimer disease provided by 11C-deuterium-L-deprenyl: a multitracers PET paradigm combining 11C-Pittsburgh compound B and 18F-FDG. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2012;53(1):37-46.
- Casado A, Encarnacion Lopez-Fernandez M, Concepcion Casado M, de La Torre R. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. *Neurochemical research*. 2008;33(3):450-8.
- Chen S-L, Tao P-L, Chu C-H, Chen S-H, Wu H-E, Tseng LF, Hong J-S, Lu R-B. Low-dose memantine attenuated morphine addictive behavior

- through its anti-inflammation and neurotrophic effects in rats. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 2012;7(2):444-53.
- Choi DY, Lee YJ, Hong JT, Lee HJ. Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. *Brain research bulletin*. 2012;87(2-3):144-53.
- Christensen R, Marcussen AB, Wörtwein G, Knudsen GM, Aznar S. A β (1-42) injection causes memory impairment, lowered cortical and serum BDNF levels, and decreased hippocampal 5-HT2A levels. *Experimental neurology*. 2008;210(1):164-71.
- Clerx L, Visser PJ, Verhey F, Aalten P. New MRI markers for Alzheimer's disease: a meta-analysis of diffusion tensor imaging and a comparison with medial temporal lobe measurements. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2012;29(2):405-29.
- Couturier J, Stancu IC, Schakman O, Pierrot N, Huaux F, Kienlen-Campard P, Dewachter I, Octave JN. Activation of phagocytic activity in astrocytes by reduced expression of the inflammasome component ASC and its implication in a mouse model of Alzheimer disease. *Journal of neuroinflammation*. 2016;13:20.
- Cumming T, Brodtmann A. Dementia and stroke: the present and future epidemic. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society*. 2010;5(6):453-4.
- Czirr E, Wyss-Coray T. The immunology of neurodegeneration. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(4):1156-63.
- D'Anna L, Abu-Rumeileh S, Fabris M, Pistis C, Baldi A, Sanvilli N, Curcio F, Gigli GL, D'Anna S, Valente M. Serum Interleukin-10 Levels Correlate with Cerebrospinal Fluid Amyloid Beta Deposition in Alzheimer Disease Patients. *Neuro-degenerative diseases*. 2017;17(4-5):227-34.
- Danysz W, Parsons CG. Alzheimer's disease, beta-amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine--searching for the connections. *British journal of pharmacology*. 2012;167(2):324-52.
- Davenport CM, Sevastou IG, Hooper C, Pocock JM. Inhibiting p53 pathways in microglia attenuates microglial-evoked neurotoxicity following exposure to Alzheimer peptides. *Journal of neurochemistry*. 2010;112(2):552-63.
- De-Paula VJ, Gattaz WF, Forlenza OV. Long-term lithium treatment increases intracellular and extracellular brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cortical and hippocampal neurons at subtherapeutic concentrations. *Bipolar disorders*. 2016;18(8):692-5.

- De Felice FG, Lourenco MV, Ferreira ST. How does brain insulin resistance develop in Alzheimer's disease? *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*. 2014;10(1 Suppl):S26-32.
- Deacon RM, Rawlins JN. T-maze alternation in the rodent. *Nature protocols*. 2006;1(1):7-12.
- Deardorff WJ, Grossberg GT. A fixed-dose combination of memantine extended-release and donepezil in the treatment of moderate-to-severe Alzheimer's disease. *Drug design, development and therapy*. 2016;10:3267-79.
- Decker H, Jurgensen S, Adrover MF, Brito-Moreira J, Bomfim TR, Klein WL, Epstein AL, De Felice FG, Jerusalinsky D, Ferreira ST. N-methyl-D-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic amyloid-beta peptide oligomers. *Journal of neurochemistry*. 2010;115(6):1520-9.
- DeIpoli AR, Rankin KP, Mucke L, Miller BL, Gorno-Tempini ML. Spatial cognition and the human navigation network in AD and MCI. *Neurology*. 2007;69(10):986-97.
- Dellu F, Fauchey V, Le Moal M, Simon H. Extension of a new two-trial memory task in the rat: influence of environmental context on recognition processes. *Neurobiology of learning and memory*. 1997;67(2):112-20.
- Di Domenico F, Pupo G, Giraldo E, Badia MC, Monllor P, Lloret A, Eugenia Schinina M, Giorgi A, Cini C, Tramutola A, Butterfield DA, Vina J, Perluigi M. Oxidative signature of cerebrospinal fluid from mild cognitive impairment and Alzheimer disease patients. *Free radical biology & medicine*. 2016;91:1-9.
- Dursun E, Gezen-Ak D, Hanagasi H, Bilgic B, Lohmann E, Ertan S, Atasoy IL, Alaylioglu M, Araz OS, Onal B, Gunduz A, Apaydin H, Kiziltan G, Ulutin T, Gurvit H, Yilmazer S. The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease. *Journal of neuroimmunology*. 2015;283:50-7.
- Engels MMA, Hillebrand A, van der Flier WM, Stam CJ, Scheltens P, van Straaten ECW. Slowing of Hippocampal Activity Correlates with Cognitive Decline in Early Onset Alzheimer's Disease. An MEG Study with Virtual Electrodes. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2016;10.
- Ezeani M, Omabe M. A New Perspective of Lysosomal Cation Channel-Dependent Homeostasis in Alzheimer's Disease. *Molecular neurobiology*. 2015.
- Fa M, Puzzo D, Piacentini R, Staniszewski A, Zhang H, Baltrons MA, Li Puma DD, Chatterjee I, Li J, Saeed F, Berman HL, Ripoli C, Gulisano W,

- Gonzalez J, Tian H, Costa JA, Lopez P, Davidowitz E, Yu WH, Haroutunian V, Brown LM, Palmeri A, Sigurdsson EM, Duff KE, Teich AF, Honig LS, Sierks M, Moe JG, D'Adamio L, Grassi C, Kanaan NM, Fraser PE, Arancio O. Extracellular Tau Oligomers Produce An Immediate Impairment of LTP and Memory. *Scientific reports*. 2016;6:19393.
- Fakhoury M. Microglia and astrocytes in Alzheimer's disease: implications for therapy. *Current neuropharmacology*. 2017.
- Fang D, Zhang Z, Li H, Yu Q, Douglas JT, Bratasz A, Kuppusamy P, Yan SS. Increased Electron Paramagnetic Resonance Signal Correlates with Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in an Alzheimer's disease Mouse Brain. *J Alzheimers Dis*. 2016.
- Ferreira ST, Lourenco MV, Oliveira MM, De Felice FG. Soluble amyloid-beta oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015;9:191.
- Ferretti MT, Allard S, Partridge V, Ducatenzeiler A, Cuello AC. Minocycline corrects early, pre-plaque neuroinflammation and inhibits BACE-1 in a transgenic model of Alzheimer's disease-like amyloid pathology. *Journal of neuroinflammation*. 2012;9:62.
- Forlenza OV, De-Paula VJ, Diniz BS. Neuroprotective effects of lithium: implications for the treatment of Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders. *ACS chemical neuroscience*. 2014;5(6):443-50.
- Forlenza OV, Diniz BS, Radanovic M, Santos FS, Talib LL, Gattaz WF. Disease-modifying properties of long-term lithium treatment for amnesic mild cognitive impairment: randomised controlled trial. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*. 2011;198(5):351-6.
- Foxe D, Leyton CE, Hodges JR, Burrell JR, Irish M, Piguet O. The neural correlates of auditory and visuospatial span in logopenic progressive aphasia and Alzheimer's disease. *Cortex*. 2016;83:39-50.
- Foyet HS, Hritcu L, Ciobica A, Stefan M, Kamtchouing P, Cojocaru D. Methanolic extract of Hibiscus asper leaves improves spatial memory deficits in the 6-hydroxydopamine-lesion rodent model of Parkinson's disease. *Journal of ethnopharmacology*. 2011;133(2):773-9.
- Fukumoto K, Mizoquchi H, Takeuchi H, Horiuchi H, Kawanokuchi J, Jin S, Mizuno T, Suzumura A. Fingolimod increases brain-derived neurotrophic factor levels and ameliorates amyloid β -induced memory impairment. *Behavioural brain research*. 2014;268: 88-93.

Gadani SP, Cronk JC, Norris GT, Kipnis J. IL-4 in the brain: a cytokine to remember. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012;189(9):4213-9.

Garcia-Esparcia P, Sideris-Lampretsas G, Hernandez-Ortega K, Grau-Rivera O, Sklaviadis T, Gelpi E, Ferrer I. Altered mechanisms of protein synthesis in frontal cortex in Alzheimer disease and a mouse model. *American journal of neurodegenerative disease*. 2017;6(2):15-25.

Garcez ML, Mina F, Bellettini-Santos T, Carneiro FG, Luz AP, Schiavo GL, Andrighetti MS, Scheid MG, Bolfe RP, Budni J. Minocycline reduces inflammatory parameters in the brain structures and serum and reverses memory impairment caused by the administration of amyloid β (1-42) in mice. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2017;77:23-31.

Gauthier S, Molinuevo JL. Benefits of combined cholinesterase inhibitor and memantine treatment in moderate-severe Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*. 2013;9(3):326-31.

Gelfo F, Cutuli D, Nobili A, De Bartolo P, D'Amelio M, Petrosini L, Caltagirone C. Chronic Lithium Treatment in a Rat Model of Basal Forebrain Cholinergic Depletion: Effects on Memory Impairment and Neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2017;56(4):1505-18.

Goedert M, Klug A, Crowther RA. Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2006;9(3 Suppl):195-207.

Gold BT, Brown CA, Hakun JG, Shaw LM, Trojanowski JQ, Smith CD. Clinically silent Alzheimer's and vascular pathologies influence brain networks supporting executive function in healthy older adults. *Neurobiology of aging*. 2017;58:102-11.

Gold M, El Khoury J. beta-amyloid, microglia, and the inflammasome in Alzheimer's disease. *Seminars in immunopathology*. 2015;37(6):607-11.

Grossberg GT, Manes F, Allegri RF, Gutierrez-Robledo LM, Gloger S, Xie L, Jia XD, Pejovic V, Miller ML, Perhach JL, Graham SM. The safety, tolerability, and efficacy of once-daily memantine (28 mg): a multinational, randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients with moderate-to-severe Alzheimer's disease taking cholinesterase inhibitors. *CNS drugs*. 2013;27(6):469-78.

Grove ML, Vardarajan BN, Hiltunen M, Nothen MM, White CC, Hamilton-Nelson KL, Epelbaum J, Maier W, Choi SH, Beecham GW, Dulury C, Herms S, Smith AV.

- Guloksuz S, Cetin EA, Cetin T, Deniz G, Oral ET, Nutt DJ. Cytokine levels in euthymic bipolar patients. *Journal of affective disorders*. 2010;126(3):458-62.
- Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature medicine*. 2015;21(7):677-87.
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, NY)*. 2002;297(5580):353-6.
- Harries LW, Bradley-Smith RM, Llewellyn DJ, Pilling LC, Fellows A, Henley W, Hernandez D, Guralnik JM, Bandinelli S, Singleton A, Ferrucci L, Melzer D. Leukocyte CCR2 expression is associated with mini-mental state examination score in older adults. *Rejuvenation research*. 2012;15(4):395-404.
- Hassanzadeh G, Hosseini A, Pasbakhsh P, Akbari M, Ghaffarpour M, Takzare N, Zahmatkesh M. Trimetazidine prevents oxidative changes induced in a rat model of sporadic type of Alzheimer's disease. *Acta medica Iranica*. 2015;53(1):17-24.
- He Y, Zeng MY, Yang D, Motro B, Nunez G. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature*. 2016;530(7590):354-7.
- Hein AM, Stasko MR, Matousek SB, Scott-McKean JJ, Maier SF, Olschowka JA, Costa AC, O'Banion MK. Sustained hippocampal IL-1 β overexpression impairs contextual and spatial memory in transgenic mice. *Brain, behavior, and immunity*. 2010;24(2):243-53.
- Heneka MT. Inflammasome activation and innate immunity in Alzheimer's disease. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2017;27(2):220-2.
- Heneka MT, Carson MJ, Khoury JE, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, Herrup K, Frautschy SA, Finsen B, Brown GC, Verkhratsky A, Yamanaka K, Koistinaho J, Latz E, Halle A, Petzold GC, Town T, Morgan D, Shinohara ML, Perry VH, Holmes C, Bazan NG, Brooks DJ, Hunot S, Joseph B, Deigendesch N, Garaschuk O, Boddeke E, Dinarello CA, Breitner JC, Cole GM, Golenbock DT, Kummer MP. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*. 2015a;14(4):388-405.
- Heneka MT, Golenbock DT, Latz E. Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nature immunology*. 2015b;16(3):229-36.
- Heneka MT, Kummer MP, Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(7):463-77.

- Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, Griep A, Axt D, Remus A, Tzeng TC, Gelpi E, Halle A, Korte M, Latz E, Golenbock DT. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*. 2013;493(7434):674-8.
- Hensley K. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: mechanisms, pathologic consequences, and potential for therapeutic manipulation. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2010;21(1):1-14.
- Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nature reviews Neuroscience*. 2015;16(6):358-72.
- Hirjak D, Wolf RC, Remmele B, Seidl U, Thomann AK, Kubera KM, Schroder J, Maier-Hein KH, Thomann PA. Hippocampal formation alterations differently contribute to autobiographic memory deficits in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Hippocampus*. 2017.
- Hohman TJ, Tommet D, Marks S, Contreras J, Jones R, Mungas D. Evaluating Alzheimer's disease biomarkers as mediators of age-related cognitive decline. *Neurobiology of aging*. 2017;58:120-8.
- Holttä M, Hansson O, Andreasson U, Hertze J, Minthon L, Nagga K, Andreasen N, Zetterberg H, Blennow K. Evaluating amyloid-beta oligomers in cerebrospinal fluid as a biomarker for Alzheimer's disease. *PloS one*. 2013;8(6):e66381.
- Hooper C, Killick R, Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*. 2008;104(6):1433-9.
- Howard R, McShane R, Lindesay J, Ritchie C, Baldwin A, Barber R, Burns A, Denning T, Findlay D, Holmes C, Jones R, Jones R, McKeith I, Macharouthu A, O'Brien J, Sheehan B, Juszcak E, Katona C, Hills R, Knapp M, Ballard C, Brown RG, Banerjee S, Adams J, Johnson T, Bentham P, Phillips PP. Nursing home placement in the Donepezil and Memantine in Moderate to Severe Alzheimer's Disease (DOMINO-AD) trial: secondary and post-hoc analyses. *The Lancet Neurology*. 2015;14(12):1171-81.
- Hritcu L, Cioanca O, Hancianu M. Effects of lavender oil inhalation on improving scopolamine-induced spatial memory impairment in laboratory rats. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2012;19(6):529-34.
- Hritcu L, Stefan M, Brandsch R, Mihasan M. Enhanced behavioral response by decreasing brain oxidative stress to 6-hydroxy-l-nicotine in Alzheimer's disease rat model. *Neuroscience letters*. 2015;591:41-7.
- Huang X-T, Li C, Peng X-P, Guo J, Yue S-J, Liu W, Zhao F-Y, Han J-Z, Huang Y-H, Yang-Li YL, Cheng Q-M, Zhou Z-G, Chen C, Feng D-D,

- Luo Z-Q. An excessive increase in glutamate contributes to glucose-toxicity in β -cells via activation of pancreatic NMDA receptors in rodent diabetes. *Scientific reports*. 2017;7:44120.
- Ikram MA, Bersano A, Manso-Calderon R, Jia JP, Schmidt H, Middleton L, Nacmias B, Siddiqi S, Adams HH. Genetics of vascular dementia - review from the ICVD working group. *BMC medicine*. 2017;15(1):48.
- Ito K, Tatebe T, Suzuki K, Hirayama T, Hayakawa M, Kubo H, Tomita T, Makino M. Memantine reduces the production of amyloid-beta peptides through modulation of amyloid precursor protein trafficking. *European journal of pharmacology*. 2017;798:16-25.
- Jack CR, Jr., Holtzman DM. Biomarker modeling of Alzheimer's disease. *Neuron*. 2013;80(6):1347-58.
- Jack CR, Jr., Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, Shaw LM, Vemuri P, Wiste HJ, Weigand SD, Lesnick TG, Pankratz VS, Donohue MC, Trojanowski JQ. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet neurology*. 2013;12(2):207-16.
- Jana M, Palencia CA, Pahan K. Fibrillar Amyloid- β Peptides Activate Microglia via TLR2: Implications for Alzheimer's Disease. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2008;181(10):7254-62.
- Karmazyn M, Manku MS, Horrobin DF. Changes of vascular reactivity induced by low vasopressin concentrations: interactions with cortisol and lithium and possible involvement of prostaglandins. *Endocrinology*. 1978;102(4):1230-6.
- Kaur B, Prakash A. Ceftriaxone attenuates glutamate-mediated neuro-inflammation and restores BDNF in MPTP model of Parkinson's disease in rats. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology*. 2017;24(2):71-9.
- Kim JK, Jin HS, Suh HW, Jo EK. Negative regulators and their mechanisms in NLRP3 inflammasome activation and signaling. *Immunology and cell biology*. 2017.
- Kitazawa M, Cheng D, Tsukamoto M, Koike M, Wes PD, Vasilevko V, Cribbs DH, LaFerla FM. Blocking Interleukin-1 Signaling Rescues Cognition, Attenuates Tau Pathology, and Restores Neuronal β -Catenin Pathway Function in an Alzheimer's Disease Model. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2011;187(12):6539-49.
- Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological reports : PR*. 2015;67(2):195-203.
- Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, DeStafano AL, Bis JC, Beecham GW, Grenier-Boley B,

Russo G, Thorton-Wells TA, Jones N, Smith AV, Chouraki V, Thomas C, Ikram MA, Zelenika D, Vardarajan BN, Kamatani Y, Lin CF, Gerrish A, Schmidt H, Kunkle B, Dunstan ML, Ruiz A, Bihoreau MT, Choi SH, Reitz C, Pasquier F, Cruchaga C, Craig D, Amin N, Berr C, Lopez OL, De Jager PL, Deramecourt V, Johnston JA, Evans D, Lovestone S, Letenneur L, Moron FJ, Rubinsztein DC, Eiriksdottir G, Sleegers K, Goate AM, Fievet N, Huentelman MW, Gill M, Brown K, Kamboh MI, Keller L, Barberger-Gateau P, McGuinness B, Larson EB, Green R, Myers AJ, Dufouil C, Todd S, Wallon D, Love S, Rogaeva E, Gallacher J, St George-Hyslop P, Clarimon J, Lleo A, Bayer A, Tsuang DW, Yu L, Tsolaki M, Bossu P, Spalletta G, Proitsi P, Collinge J, Sorbi S, Sanchez-Garcia F, Fox NC, Hardy J, Deniz Naranjo MC, Bosco P, Clarke R, Brayne C, Galimberti D, Mancuso M, Matthews F, Moebus S, Mecocci P, Del Zompo M, Maier W, Hampel H, Pilotto A, Bullido M, Panza F, Caffarra P, Nacmias B, Gilbert JR, Mayhaus M, Lannefelt L, Hakonarson H, Pichler S, Carrasquillo MM, Ingelsson M, Beekly D, Alvarez V, Zou F, Valladares O, Younkin SG, Coto E, Hamilton-Nelson KL, Gu W, Razquin C, Pastor P, Mateo I, Owen MJ, Faber KM, Jonsson PV, Combarros O, O'Donovan MC, Cantwell LB, Soininen H, Blacker D, Mead S, Mosley TH, Jr., Bennett DA, Harris TB, Fratiglioni L, Holmes C, de Bruijn RF, Passmore P, Montine TJ, Bettens K, Rotter JI, Brice A, Morgan K, Foroud TM, Kukull WA, Hannequin D, Powell JF, Nalls MA, Ritchie K, Lunetta KL, Kauwe JS, Boerwinkle E, Riemenschneider M, Boada M, Hiltunen M, Martin ER, Schmidt R, Rujescu D, Wang LS, Dartigues JF, Mayeux R, Tzourio C, Hofman A, Nothen MM, Graff C, Psaty BM, Jones L, Haines JL, Holmans PA, Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, DeStafano AL, Bis JC, Beecham GW, Grenier-Boley B, Russo G, Thorton-Wells TA, Jones N, Smith AV, Chouraki V, Thomas C, Ikram MA, Zelenika D, Vardarajan BN, Kamatani Y, Lin CF, Gerrish A, Schmidt H, Kunkle B, Dunstan ML, Ruiz A, Bihoreau MT, Choi SH, Reitz C, Pasquier F, Cruchaga C, Craig D, Amin N, Berr C, Lopez OL, De Jager PL, Deramecourt V, Johnston JA, Evans D, Lovestone S, Letenneur L, Moron FJ, Rubinsztein DC, Eiriksdottir G, Sleegers K, Goate AM, Fievet N, Huentelman MW, Gill M, Brown K, Kamboh MI, Keller L, Barberger-Gateau P, McGuinness B, Larson EB, Green R, Myers AJ, Dufouil C, Todd S, Wallon D, Love S, Rogaeva E, Gallacher J, St George-Hyslop P, Clarimon J, Lleo A, Bayer A, Tsuang DW, Yu L, Tsolaki M, Bossu P, Spalletta G, Proitsi P, Collinge J, Sorbi S, Sanchez-Garcia F, Fox NC, Hardy J, Deniz Naranjo MC, Bosco P, Clarke R, Brayne C, Galimberti D, Mancuso M, Matthews F, Moebus S, Mecocci

P, Del Zompo M, Maier W, Hampel H, Pilotto A, Bullido M, Panza F, Caffarra P, Nacmias B, Gilbert JR, Mayhaus M, Lannefelt L, Hakonarson H, Pichler S, Carrasquillo MM, Ingelsson M, Beekly D, Alvarez V, Zou F, Valladares O, Younkin SG, Coto E, Hamilton-Nelson KL, Gu W, Razquin C, Pastor P, Mateo I, Owen MJ, Faber KM, Jonsson PV, Combarros O, O'Donovan MC, Cantwell LB, Soininen H, Blacker D, Mead S, Mosley TH, Jr., Bennett DA, Harris TB, Fratiglioni L, Holmes C, de Bruijn RF, Passmore P, Montine TJ, Bettens K, Rotter JI, Brice A, Morgan K, Foroud TM, Kukull WA, Hannequin D, Powell JF, Nalls MA, Ritchie K, Lunetta KL, Kauwe JS, Boerwinkle E, Riemenschneider M, Boada M, Hiltunen M, Martin ER, Schmidt R, Rujescu D, Wang LS, Dartigues JF, Mayeux R, Tzourio C, Hofman A, Nothen MM, Graff C, Psaty BM, Jones L, Haines JL, Holmans PA, Lathrop M, Pericak-Vance MA, Launer LJ, Farrer LA, van Duijn CM, Van Broeckhoven C, Moskvina V, Seshadri S, Williams J, Schellenberg GD, Amouyel P. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature Genetics*. 2013;45(12):1452-8.

Lathrop M, Pericak-Vance MA, Launer LJ, Farrer LA, van Duijn CM, Van Broeckhoven C, Moskvina V, Seshadri S, Williams J, Schellenberg GD, Amouyel P. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature Genetics*. 2013;45(12):1452-8.

Lanctot KL, Rajaram RD, Herrmann N. Therapy for Alzheimer's Disease: How Effective are Current Treatments? *Therapeutic advances in neurological disorders*. 2009;2(3):163-80.

Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Guerrero-Munoz MJ, Kiritoshi T, Neugebauer V, Jackson GR, Kaye R. Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Scientific reports*. 2012;2:700.

Lasagna-Reeves CA, Glabe CG, Kaye R. Amyloid- β Annular Protofibrils Evade Fibrillar Fate in Alzheimer Disease Brain. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(25):22122-30.

Lee SH, Suk K. Emerging roles of protein kinases in microglia-mediated neuroinflammation. *Biochemical pharmacology*. 2017.

Letiembre M, Liu Y, Walter S, Hao W, Pfander T, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, Fassbender K. Screening of innate immune receptors in neurodegenerative diseases: A similar pattern. *Neurobiology of aging*. 2009;30(5):759-68.

Leyhe T, Eschweiler GW, Stransky E, Gasser T, Annas P, Basun H, Laske C. Increase of BDNF serum concentration in lithium treated patients with

early Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease* : JAD. 2009;16(3):649-56.

Li H, Li Q, Du X, Sun Y, Wang X, Kroemer G, Blomgren K, Zhu C. Lithium-mediated long-term neuroprotection in neonatal rat hypoxia-ischemia is associated with antiinflammatory effects and enhanced proliferation and survival of neural stem/progenitor cells. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2011;31(10):2106-15.

Li L, Sengupta A, Haque N, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Memantine inhibits and reverses the Alzheimer type abnormal hyperphosphorylation of tau and associated neurodegeneration. *FEBS letters*. 2004;566(1-3):261-9.

Liston A, Masters SL. Homeostasis-altering molecular processes as mechanisms of inflammasome activation. *Nature reviews Immunology*. 2017;17(3):208-14.

Liu J, Wang J, Tang Z, Hu B, Wu FX, Pan Y. Improving Alzheimer's Disease Classification

by Combining Multiple Measures. *IEEE/ACM transactions on computational biology and bioinformatics*. 2017a.

Liu MY, Wang S, Yao WF, Zhang ZJ, Zhong X, Sha L, He M, Zheng ZH, Wei MJ. Memantine improves spatial learning and memory impairments by regulating NGF signaling in APP/PS1 transgenic mice. *Neuroscience*. 2014;273:141-51.

Liu S, Liu Y, Hao W, Wolf L, Kiliaan AJ, Penke B, Rube CE, Walter J, Heneka MT, Hartmann T, Menger MD, Fassbender K. TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid beta peptide to trigger neuroinflammatory activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012;188(3):1098-107.

Liu W, Wang H, Wang Y, Li H, Ji L. Metabolic factors-triggered inflammatory response drives antidepressant effects of exercise in CUMS rats. *Psychiatry Res*. 2015;228(3):257-64.

Liu YL, Chen WT, Lin YY, Lu PH, Hsieh SL, Cheng IH. Amelioration of amyloid-beta-induced deficits by DcR3 in an Alzheimer's disease model. *Molecular neurodegeneration*. 2017b;12(1):30.

Lo RY. The borderland between normal aging and dementia. *Ci ji yi xue za zhi = Tzu-chi medical journal*. 2017;29(2):65-71.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951;193(1):265-75.

Lu SM, Gui B, Dong HQ, Zhang X, Zhang SS, Hu LQ, Liu HL, Sun J, Qian YN. Prophylactic lithium alleviates splenectomy-induced cognitive

dysfunction possibly by inhibiting hippocampal TLR4 activation in aged rats. *Brain research bulletin*. 2015;114:31-41.

Lyons A, Griffin RJ, Costelloe CE, Clarke RM, Lynch MA. IL-4 attenuates the neuroinflammation induced by amyloid-beta in vivo and in vitro. *Journal of neurochemistry*. 2007;101(3):771-81.

Ma Y, Cheng Q, Wang E, Li L, Zhang X. Inhibiting tumor necrosis factor- α signaling attenuates postoperative cognitive dysfunction in aged rats. *Molecular medicine reports*. 2015;12(2):3095-100.

Madeira MH, Ambrosio AF, Santiago AR. Glia-Mediated Retinal Neuroinflammation as a Biomarker in Alzheimer's Disease. *Ophthalmic research*. 2015;54(4):204-11.

Martin M, Rehani K, Joep RS, Michalek SM. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nature immunology*. 2005;6(8):777-84.

Mauer S, Vergne D, Ghaemi SN. Standard and trace-dose lithium: a systematic review of dementia prevention and other behavioral benefits. *The Australian and New Zealand journal of psychiatry*. 2014;48(9):809-18.

McDonald CR, Gharapetian L, McEvoy LK, Fennema-Notestine C, Hagler DJ, Jr., Holland D, Dale AM. Relationship between regional atrophy rates and cognitive decline in mild cognitive impairment. *Neurobiology of aging*. 2012;33(2):242-53.

McShane R, Areosa Sastre A, Minakaran N. Memantine for dementia. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2006(2):CD003154.

Mehdizadeh M, Hashem Dabaghian F, Shoojaee A, Molavi N, Taslimi Z, Shabani R, Soleimani ASI S. Protective Effects of *Cyperus Rotundus* Extract on Amyloid β -Peptide (1-40)-Induced Memory Impairment in Male Rats: A Behavioral Study. *Basic and clinical neuroscience*. 2017; 8(3): 249-254.

Meyer-Luehmann M, Spires-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, de Calignon A, Rozkalne A, Koenigsknecht-Talboo J, Holtzman DM, Bacskai BJ, Hyman BT. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2008;451(7179):720-4.

Miklowitz DJ, Johnson SL. The psychopathology and treatment of bipolar disorder. *Annual review of clinical psychology*. 2006;2:199-235.

Moreno-Ortega AJ, Buendia I, Mouhid L, Egea J, Lucea S, Ruiz-Nuno A, Lopez MG, Cano-Abad MF. CALHM1 and its polymorphism P86L differentially control Ca homeostasis, mitogen-activated protein kinase

signaling, and cell vulnerability upon exposure to amyloid beta. *Aging cell*. 2015.

Moslemnezhad A, Mahjoub S, Moghadasi M. Altered plasma marker of oxidative DNA damage and total antioxidant capacity in patients with Alzheimer's disease. *Caspian journal of internal medicine*. 2016;7(2):88-92.

Mrak RE. Neuropathology and the neuroinflammation idea. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2009;18(3):473-81.

Mudireddy SR, Abdul AR, Gorjala P, Gary RK. Beryllium is an inhibitor of cellular GSK-3beta that is 1,000-fold more potent than lithium. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*. 2014;27(6):1203-16.

Mury FB, da Silva WC, Barbosa NR, Mendes CT, Bonini JS, Sarkis JE, Cammarota M, Izquierdo I, Gattaz WF, Dias-Neto E. Lithium activates brain phospholipase A2 and improves memory in rats: implications for Alzheimer's disease. 2016;266(7):607-18.

Nahman S, Belmaker RH, Azab AN. Effects of lithium on lipopolysaccharide-induced inflammation in rat primary glia cells. *Innate immunity*. 2012;18(3):447-58.

Nakamura A, Cuesta P. Early functional network alterations in asymptomatic elders at risk for Alzheimer's disease. 2017;7(1):6517.

Nanaware S, Shelar M, Sinnathambi A, Mahadik KR, Lohidasan S. Neuroprotective effect of Indian propolis in beta-amyloid induced memory deficit: Impact on behavioral and biochemical parameters in rats. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2017;93:543-53.

Nassar A. Effects of Lithium on Inflammation. 2014;5(6):451-8.

Nery LR, Eltz NS, Hackman C, Fonseca R, Altenhofen S, Guerra HN, Freitas VM, Bonan CD, Vianna MR. Brain intraventricular injection of amyloid-beta in zebrafish embryo impairs cognition and increases tau phosphorylation, effects reversed by lithium. *PloS one*. 2014;9(9):e105862.

Nie L, Wei G, Peng S, Qu Z, Yang Y, Yang Q, Huang X, Liu J, Zhuang Z, Yang X. Melatonin ameliorates anxiety and depression-like behaviors and modulates proteomic changes in triple transgenic mice of Alzheimer's disease. 2017.

Niemantsverdriet E, Valckx S, Bjerke M, Engelborghs S. Alzheimer's disease CSF biomarkers: clinical indications and rational use. 2017.

Nunes MA, Schowe NM, Monteiro-Silva KC, Baraldi-Tornisielo T, Souza SI, Balthazar J, Albuquerque MS, Caetano AL, Viel TA, Buck HS. Chronic Microdose Lithium Treatment Prevented Memory Loss and

- Neurohistopathological Changes in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PloS one*. 2015;10(11):e0142267.
- Nunes MA, Viel TA, Buck HS. Microdose lithium treatment stabilized cognitive impairment in patients with Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research*. 2013;10(1):104-7.
- O'Leime CS, Cryan JF, Nolan YM. Nuclear Deterrents: Intrinsic Regulators of IL-1 β -induced Effects on Hippocampal Neurogenesis. *Brain, behavior, and immunity*. 2017.
- Ota H, Ogawa S, Ouchi Y, Akishita M. Protective effects of NMDA receptor antagonist, memantine, against senescence of PC12 cells: A possible role of nNOS and combined effects with donepezil. *Experimental gerontology*. 2015;72:109-16.
- Park SJ, Jung JM, Lee HE, Lee YW, Kim DH, Kim JM, Hong JG, Lee CH, Jung IH, Cho YB, Jang DS, Ryu JH. The memory ameliorating effects of INM-176, an ethanolic extract of *Angelica gigas*, against scopolamine- or A β (1-42)-induced cognitive dysfunction in mice. *Journal of ethnopharmacology*. 2012;143(2):611-20.
- Paula-Lima AC, Adasme T, SanMartin C, Sebollela A, Hetz C, Carrasco MA, Ferreira ST, Hidalgo C. Amyloid β -peptide oligomers stimulate RyR-mediated Ca²⁺ release inducing mitochondrial fragmentation in hippocampal neurons and prevent RyR-mediated dendritic spine remodeling produced by BDNF. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;14(7):1209-23.
- Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS. GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid- β peptides. *Nature*. 2003;423(6938):435-9.
- Puzzo D, Gulisano W, Arancio O, Palmeri A. The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in A β physiology. *Neuroscience*. 2015;307:26-36.
- Radi E, Formichi P, Battisti C, Federico A. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2014;42 Suppl 3:S125-52.
- Rai S, Kamat PK, Nath C, Shukla R. A study on neuroinflammation and NMDA receptor function in STZ (ICV) induced memory impaired rats. *Journal of neuroimmunology*. 2013;254(1-2):1-9.
- Rainer M, Wuschitz A, Jagsch C, Erb C, Chirikdjian JJ, Mucke HA. Memantine in moderate to severe Alzheimer's disease: an observational post-marketing study. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*. 2011;118(8):1255-9.
- Ramanan VK, Risacher SL, Nho K, Kim S, Shen L, McDonald BC, Yoder KK, Hutchins GD, West JD, Tallman EF, Gao S, Foroud TM, Farlow

MR, De Jager PL, Bennett DA, Aisen PS, Petersen RC, Jack CR, Toga AW, Green RC, Jagust WJ, Weiner MW, Saykin AJ, for the Alzheimer's Disease Neuroimaging I. GWAS of longitudinal amyloid accumulation on (18)F-florbetapir PET in Alzheimer's disease implicates microglial activation gene IL1RAP. *Brain : a journal of neurology*. 2015;138(10):3076-88.

Ramirez-Bermudez J. Alzheimer's disease: critical notes on the history of a medical concept. *Archives of medical research*. 2012;43(8):595-9.

Ramos Bernardes da Silva Filho S, Oliveira Barbosa JH, Rondinoni C, Dos Santos AC, Garrido Salmon CE, da Costa Lima NK, Ferrioli E, Moriguti JC. Neuro-degeneration profile of Alzheimer's patients: A brain morphometry study. *NeuroImage Clinical*. 2017;15:15-24.

Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nature neuroscience*. 2016;19(8):987-91.

Rapaport MH, Manji HK. The effects of lithium on ex vivo cytokine production. *Biological psychiatry*. 2001;50(3):217-24.

Rapsinski GJ, Wynosky-Dolfi MA, Oppong GO, Tursi SA, Wilson RP, Brodsky IE, Tukul C. Toll-like receptor 2 and NLRP3 cooperate to recognize a functional bacterial amyloid, curli. *Infection and immunity*. 2015;83(2):693-701.

Reas ET, Hagler DJ, Jr., White NS, Kuperman JM, Bartsch H, Cross K, Loi RQ, Balachandra AR, Meloy MJ, Wierenga CE, Galasko D, Brewer JB, Dale AM, McEvoy LK. Sensitivity of restriction spectrum imaging to memory and neuropathology in Alzheimer's disease. *Alzheimer's research & therapy*. 2017;9(1):55.

Reisberg B, Doody R, Stoffler A, Schmitt F, Ferris S, Mobius HJ. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine*. 2003;348(14):1333-41.

Resende R, Ferreira E, Pereira C, Resende de Oliveira C. Neurotoxic effect of oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptide 1-42: involvement of endoplasmic reticulum calcium release in oligomer-induced cell death. *Neuroscience*. 2008;155(3):725-37.

Rezazadeh M, Khorrami A, Yeghaneh T, Talebi M, Kiani SJ, Heshmati Y, Ghahesouran J. Genetic Factors Affecting Late-Onset Alzheimer's Disease Susceptibility. *Neuromolecular medicine*. 2016;18(1):37-49.

Riverol M, Slachevsky A, Lopez OL. Efficacy and Tolerability of a Combination Treatment of Memantine and Donepezil for Alzheimer's Disease: A Literature Review Evidence. *European neurological journal*. 2011;3(1):15-9.

- Rockenstein E, Torrance M, Adame A, Mante M, Bar-on P, Rose JB, Crews L, Masliah E. Neuroprotective effects of regulators of the glycogen synthase kinase-3 β signaling pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease are associated with reduced amyloid precursor protein phosphorylation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(8):1981-91.
- Rowe MK, Chuang DM. Lithium neuroprotection: molecular mechanisms and clinical implications. *Expert reviews in molecular medicine*. 2004;6(21):1-18.
- Ruiz-Muñoz AM, Nieto-Escamez FA, Aznar S, Colomina MT, Sanchez-Santed F. Cognitive and histological disturbances after chlorpyrifos exposure and chronic A β (1–42) infusions in Wistar rats. *NeuroToxicology*. 2011;32(6):836-44.
- Salehi-Sadaghiani M, Javadi-Paydar M, Gharedaghi MH, Zandieh A, Heydarpour P, Yousefzadeh-Fard Y, Dehpour AR. NMDA receptor involvement in antidepressant-like effect of pioglitazone in the forced swimming test in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012;223(3):345-55.
- Sallaberry C, Nunes F, Costa MS, Fioreze GT, Ardais AP, Botton PH, Klaudat B, Forte T, Souza DO, Elisabetsky E, Porciuncula LO. Chronic caffeine prevents changes in inhibitory avoidance memory and hippocampal BDNF immunocontent in middle-aged rats. *Neuropharmacology*. 2013;64:153-9.
- Saresella M, La Rosa F, Piancone F, Zoppis M, Marventano I, Calabrese E, Rainone V, Nemni R, Mancuso R, Clerici M. The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*. 2016;11:23.
- Saura CA, Parra-Damas A, Enriquez-Barreto L. Gene expression parallels synaptic excitability and plasticity changes in Alzheimer's disease. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015;9:318.
- Savva GM, Wharton SB, Ince PG, Forster G, Matthews FE, Brayne C. Age, neuropathology, and dementia. *The New England journal of medicine*. 2009;360(22):2302-9.
- Schaeffer EL, Catanozi S, West MJ, Gattaz WF. Stereological investigation of the CA1 pyramidal cell layer in untreated and lithium-treated 3xTg-AD and wild-type mice. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*. 2017;209:51-60.

Schipper HM. Apolipoprotein E: implications for AD neurobiology, epidemiology and risk assessment. *Neurobiology of aging*. 2011;32(5):778-90.

Schmidt R, Hofer E, Bouwman FH, Buerger K, Cordonnier C, Fladby T, Galimberti D, Georges J, Heneka MT, Hort J, Laczó J, Molinuevo JL, O'Brien JT, Religa D, Scheltens P, Schott JM, Sorbi S. EFNS-ENS/EAN Guideline on concomitant use of cholinesterase inhibitors and memantine in moderate to severe Alzheimer's disease. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2015;22(6):889-98.

Schmidt R, Neff F, Lampl C, Benke T, Anditsch M, Bancher C, Dal-Bianco P, Reisecker F, Marksteiner J, Rainer M, Kapeller P, Dodel R. [Therapy of Alzheimer's disease: current status and future development]. *Neuropsychiatrie : Klinik, Diagnostik, Therapie und Rehabilitation : Organ der Gesellschaft Österreichischer Nervenärzte und Psychiater*. 2008;22(3):153-71.

Selkoe DJ. Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behavioural brain research*. 2008;192(1):106-13.

Sengupta U, Portelius E, Hansson O, Farmer K, Castillo-Carranza D, Woltjer R, Zetterberg H, Galasko D, Blennow K, Kayed R. Tau oligomers in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Annals of clinical and translational neurology*. 2017;4(4):226-35.

Serra G, De Chiara L, Manfredi G, Koukopoulos AE, Sani G, Girardi P, Koukopoulos A, Serra G. Memantine in the management of affective recurrences of bipolar disorders after the discontinuation of long-term lithium treatment: three case histories. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*. 2014;4(1):53-5.

Shah RS, Lee HG, Xiongwei Z, Perry G, Smith MA, Castellani RJ. Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2008;62(4):199-207.

Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(11):2866-75.

Sil S, Ghosh T, Ghosh R. NMDA receptor is involved in neuroinflammation in intracerebroventricular colchicine-injected rats. *Journal of immunotoxicology*. 2016;13(4):474-89.

- Sims R, van der Lee SJ. Rare coding variants in PLCG2, ABI3, and TREM2 implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. 2017.
- Smith DA. Treatment of Alzheimer's disease in the long-term-care setting. American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists. 2009;66(10):899-907.
- Sofola-Adesakin O, Castillo-Quan JI, Rallis C, Tain LS, Bjedov I, Rogers I, Li L, Martinez P, Khericha M, Cabecinha M, Bähler J, Partridge L. Lithium suppresses A β pathology by inhibiting translation in an adult *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Frontiers in aging neuroscience*. 2014;6:190.
- Sohrabifar N, Gharesouran J, Talebi M, Ghojzadeh M, Mohaddes Ardebili SM. Association of CLU and TLR2 gene polymorphisms with late-onset Alzheimer disease in a northwestern Iranian population. *Turkish journal of medical sciences*. 2015;45(5):1082-6.
- Solfrizzi V, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso C, Todarello O, Pellicani V, Capurso SA, Pietrarossa G, Santamato V, Capurso A, Panza F. Circulating biomarkers of cognitive decline and dementia. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2006;364(1-2):91-112.
- Song MS, Rauw G, Baker GB, Kar S. Memantine protects rat cortical cultured neurons against beta-amyloid-induced toxicity by attenuating tau phosphorylation. *The European journal of neuroscience*. 2008;28(10):1989-2002.
- Spencer JP, Vafeiadou K, Williams RJ, Vauzour D. Neuroinflammation: modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Molecular aspects of medicine*. 2012;33(1):83-97.
- Stella F, Radanovic M, Canineu PR, de Paula VJ, Forlenza OV. Anti-dementia medications: current prescriptions in clinical practice and new agents in progress. *Therapeutic advances in drug safety*. 2015;6(4):151-65.
- Sudduth TL, Wilson JG, Everhart A, Colton CA, Wilcock DM. Lithium Treatment of APP^{SwDI}/NOS2^{-/-} Mice Leads to Reduced Hyperphosphorylated Tau, Increased Amyloid Deposition and Altered Inflammatory Phenotype. *PloS one*. 2012;7(2):e31993.
- Suhs KW, Gudi V, Eckermann N, Fairless R, Pul R, Skripuletz T, Stangel M. Cytokine regulation by modulation of the NMDA receptor on astrocytes. *Neurosci Lett*. 2016;629:227-33.

- Sulkowski G, Dabrowska-Bouta B, Chalimoniuk M, Struzynska L. Effects of antagonists of glutamate receptors on pro-inflammatory cytokines in the brain cortex of rats subjected to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*. 2013;261(1-2):67-76.
- Sun X, Chen WD, Wang YD. beta-Amyloid: the key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Frontiers in pharmacology*. 2015;6:221.
- Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014;1319:82-95.
- Tajes M, Gutierrez-Cuesta J, Folch J, Ferrer I, Caballero B, Smith MA, Casadesus G, Camins A, Pallas M. Lithium treatment decreases activities of tau kinases in a murine model of senescence. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2008;67(6):612-23.
- Tan LC, Zhao L, Liu XH, Deng CM, Guan ZZ. [Antagonism of lovastatin on oxidative stress and apoptosis in primary rat hippocampal neurons induced by beta-amyloid peptide]. *Zhonghua bing li xue za zhi = Chinese journal of pathology*. 2017;46(7):491-6.
- Toledo EM, Inestrosa NC. Activation of Wnt signaling by lithium and rosiglitazone reduced spatial memory impairment and neurodegeneration in brains of an APPswe/PSEN1DeltaE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular psychiatry*. 2010;15(3):272-85, 28.
- Tu S, Wong S, Hodges JR, Irish M, Piguet O, Hornberger M. Lost in spatial translation - A novel tool to objectively assess spatial disorientation in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Cortex*. 2015;67:83-94.
- Ueda K, Fukui Y, Kageyama H. Amyloid β protein-induced neuronal cell death: neurotoxic properties of aggregated amyloid β protein. *Brain research*. 1994;639(2):240-4.
- Valvassori SS, Tonin PT, Varela RB, Carvalho AF, Mariot E, Amboni RT, Bianchini G, Andersen ML, Quevedo J. Lithium modulates the production of peripheral and cerebral cytokines in an animal model of mania induced by dextroamphetamine. *Bipolar disorders*. 2015;17(5):507-17.
- Vanaja SK, Rathinam VA, Fitzgerald KA. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends in cell biology*. 2015;25(5):308-15.
- Venneti S, Lopresti BJ, Wiley CA. Molecular imaging of microglia/macrophages in the brain. *Glia*. 2013;61(1):10-23.

- Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learning & memory* (Cold Spring Harbor, NY). 2000;7(5):333-40.
- Vo TM, Perry P, Ellerby M, Bohnert K. Is lithium a neuroprotective agent? *Annals of clinical psychiatry : official journal of the American Academy of Clinical Psychiatrists*. 2015;27(1):49-54.
- Wang D, Zhang J, Jiang W, Cao Z, Zhao F, Cai T, Aschner M, Luo W. The role of NLRP3-CASP1 in inflammasome-mediated neuroinflammation and autophagy dysfunction in manganese-induced, hippocampal-dependent impairment of learning and memory ability. *Autophagy*. 2017a:1-14.
- Wang F, Zou Z, Gong Y, Yuan D, Chen X, Sun T. Regulation of Human Brain Microvascular Endothelial Cell Adhesion and Barrier Functions by Memantine. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2017b;62(1):123-9.
- Wang G-L, He Z-M, Zhu H-Y, Gao Y-G, Zhao Y, Yang H, Zhang L. Involvement of serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems in the antidepressant-like effect of ginsenoside Rb1, a major active ingredient of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Journal of ethnopharmacology*. Wang H, Brown J, Martin M. Glycogen synthase kinase 3: a point of convergence for the host inflammatory response. *Cytokine*. 2011a;53(2):130-40.
- Wang J-H, Lei X, Cheng X-R, Zhang X-R, Liu G, Cheng J-P, Xu Y-R, Zeng J, Zhou W-X, Zhang Y-X. LW-AFC, a new formula derived from Liuwei Dihuang decoction, ameliorates behavioral and pathological deterioration via modulating the neuroendocrine-immune system in PrP^{hAβPPswe/PS1(ΔE9)} transgenic mice. *Alzheimer's Research & Therapy*. 2016a;8:57.
- Wang LZ, Tian Y, Yu JT, Chen W, Wu ZC, Zhang Q, Zhang W, Tan L. Association between late-onset Alzheimer's disease and microsatellite polymorphisms in intron II of the human toll-like receptor 2 gene. *Neurosci Lett*. 2011b;489(3):164-7.
- Wang SW, Yang SG, Liu W, Zhang YX, Xu PX, Wang T, Ling TJ, Liu RT. Alpha-tocopherol quinine ameliorates spatial memory deficits by reducing beta-amyloid oligomers, neuroinflammation and oxidative stress in transgenic mice with Alzheimer's disease. *Behavioural brain research*. 2016b;296:109-17.
- Wang X, Chen J, Wang H, Yu H, Wang C, You J, Wang P, Feng C, Xu G, Wu X, Zhao R, Zhang G. Memantine Can Reduce Ethanol-Induced

Caspase-3 Activity and Apoptosis in H4 Cells by Decreasing Intracellular Calcium. *Journal of molecular neuroscience* : MN. 2017c;62(3-4):402-11.

Webster KM, Sun M, Crack P, O'Brien TJ, Shultz SR, Semple BD. Inflammation in epileptogenesis after traumatic brain injury. *Journal of neuroinflammation*. 2017;14:10.

Weng X, Tan Y, Chu X, Wu X-F, Liu R, Tian Y, Li L, Guo F, Ouyang Q, Li L. N-methyl-D-aspartic acid receptor 1 (NMDAR1) aggravates secondary inflammatory damage induced by hemin-NLRP3 pathway after intracerebral hemorrhage. *Chinese Journal of Traumatology*. 2015;18(5):254-8.

Wenk GL. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease: potential targets for treatment. *The Journal of clinical psychiatry*. 2006;67 Suppl 3:3-7; quiz 23.

Westin K, Buchhave P, Nielsen H, Minthon L, Janciauskiene S, Hansson O. CCL2 is associated with a faster rate of cognitive decline during early stages of Alzheimer's disease. *PloS one*. 2012;7(1):e30525.

Wilkinson D, Andersen HF. Analysis of the effect of memantine in reducing the worsening of clinical symptoms in patients with moderate to severe Alzheimer's disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 2007;24(2):138-45.

Wilson EN, Do Carmo S, Iulita MF, Hall H, Ducatenzeiler A, Marks AR, Allard S, Jia DT, Windheim J, Cuellar AC. BACE1 inhibition by microdose lithium formulation NP03 rescues memory loss and early stage amyloid neuropathology. *Translational psychiatry*. 2017;7(8):e1190.

Wu H-M, Tzeng N-S, Qian L, Wei S-J, Hu X, Chen S-H, Rawls SM, Flood P, Hong J-S, Lu R-B. Novel Neuroprotective Mechanisms of Memantine: Increase in Neurotrophic Factor Release from Astroglia and Anti-Inflammation by Preventing Microglial Activation. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology. 2009;34(10):2344-57.

Yanagida K, Tagami S, Okochi M. [Cerebrospinal Fluid and Blood Biomarkers in Alzheimer's Disease]. *Brain and nerve = Shinkei kenkyu no shinpo*. 2017;69(7):825-33.

Yi L, Liu W, Wang Z, Ren D, Peng W. Characterizing Alzheimer's disease through metabolomics and investigating anti-Alzheimer's disease effects of natural products. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2017;1398(1):130-41.

Yu F, Wang Z, Tchantchou F, Chiu CT, Zhang Y, Chuang DM. Lithium ameliorates neurodegeneration, suppresses neuroinflammation, and

- improves behavioral performance in a mouse model of traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2012;29(2):362-74.
- Yu NN, Tan MS, Yu JT, Xie AM, Tan L. The Role of Reelin Signaling in Alzheimer's Disease. *Molecular neurobiology*. 2015.
- Zadori D, Veres G, Szalardy L, Klivenyi P, Toldi J, Vecsei L. Glutamatergic dysfunctioning in Alzheimer's disease and related therapeutic targets. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2014;42 Suppl 3:S177-87.
- Zhang F, Jiang L. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric disease and treatment*. 2015;11:243-56.
- Zhang P, Katz J, Michalek SM. Glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) inhibition suppresses the inflammatory response to *Francisella* infection and protects against tularemia in mice. *Molecular immunology*. 2009;46(4):677-87.
- Zhang R, Miller RG, Madison C, Jin X, Honrada R, Harris W, Katz J, Forshew DA, McGrath MS. Systemic immune system alterations in early stages of Alzheimer's disease. *Journal of neuroimmunology*. 2013;256(1-2):38-42.
- Zhao J, Wang H, Huang Y, Zhang H, Wang S, Gaskin F, Yang N, Fu SM. Lupus nephritis: glycogen synthase kinase 3 β promotion of renal damage through activation of the NLRP3 inflammasome in lupus-prone mice. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2015a;67(4):1036-44.
- Zhao L, Gong N, Liu M, Pan X, Sang S, Sun X, Yu Z, Fang Q, Zhao N, Fei G, Jin L, Zhong C, Xu T. Beneficial synergistic effects of microdose lithium with pyrroloquinoline quinone in an Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiology of aging*. 2014;35(12):2736-45.
- Zhao X, Wang H, Sun G, Zhang J, Edwards NJ, Aronowski J. Neuronal Interleukin-4 as a Modulator of Microglial Pathways and Ischemic Brain Damage. *The Journal of Neuroscience*. 2015b;35(32):11281-91.
- Zheng J, Liu Z, Li W, Tang J, Zhang D, Tang X. Lithium posttreatment confers neuroprotection through glycogen synthase kinase-3 β inhibition in intracerebral hemorrhage rats. *Journal of neurosurgery*. 2016:1-9.
- Zhou K, Shi L, Wang Y, Chen S, Zhang J. Recent Advances of the NLRP3 Inflammasome in Central Nervous System Disorders. *Journal of Immunology Research*. 2016;2016:9238290.
- Zhou K, Xie C, Wickstrom M, Dolga AM, Zhang Y, Li T, Xu Y, Culmsee C, Kogner P, Zhu C, Blomgren K. Lithium protects hippocampal progenitors, cognitive performance and hypothalamus-pituitary function after irradiation to the juvenile rat brain. *Oncotarget*. 2017;8(21):34111-27.

ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade do Extremo Sul Catarinense Comissão de Ética no Uso de Animais

Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex e pela Lei Federal 11.794/08, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 024/2015-1

Professora responsável: Josiane Budni

Equipe: João Luciano de Quevedo, José Mauro Moraes dos Santos, Franciele Gonçalves Mina, Michelle Lima Garcez, Sabrina da Silva, Tatiani Bellettini, Erico Pigozzi Cassaro, Gustavo Luis Schiavo

Título: Verificar o Efeito Protetor da Associação do Lítio e Memantina ou Galantamina em um Modelo Animal de Doença de Alzheimer Induzido pelo Peptídeo Aβ1-42.

*Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA. Foi autorizada a utilização do total de 360 Ratos Wistar machos, de 60 dias e pesando aproximadamente 300g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.*

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Protocol number: 024/2015-1

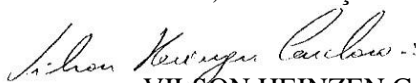
Principal Investigator: Josiane Budni

Researchers: João Luciano de Quevedo, José Mauro Moraes dos Santos, Franciele Gonçalves Mina, Michelle Lima Garcez, Sabrina da Silva, Tatiani Bellettini, Erico Pigozzi Cassaro, Gustavo Luis Schiavo

Project title: Evaluation of protective effect of Lithium combined with Memantine or Galantamine on Animal Model of Alzheimer's Disease Induced by A β 1-42 Peptide.

*The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.*

Criciúma, 25 de março de 2015.



VILSON HEINZEN CARDOSO

Coordenador Adjunto da CEUA